THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

par

Jeannette SORIA
Attaché de Recherches à l'I.N.S.E.R.M.

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'étude de la physiopathologie de la fibrinoformation

Application particulière à l'exploration biologique d'une dysfibrinogénémie familiale

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

---

soutenues le **7 Novembre 1968**

Président du jury : M. le Professeur M. PIETTE

Membres du jury : M. le Professeur M.L. GIRARD
M. le Professeur J. BOUSSER

J.A.T.
1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538115_0039

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

par

Jeannette SORIA
Attaché de Recherches à l'I.N.S.E.R.M.

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'étude de la physiopathologie de la fibrinoformation

Application particulière à l'exploration biologique d'une dysfibrinogénémie familiale

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

---

soutenues le **7 Novembre 1968**

Président du jury : M. le Professeur M. PIETTE

Membres du jury : M. le Professeur M.L. GIRARD
M. le Professeur J. BOUSSER

J.A.T.
1968

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MALANGEAU P.	DOYEN
GUILLOT M.	Assesseur, O ✻
DELAVEAU P	Assesseur
RODINEAU L.	Secrétaire Général, ✻
FERRARI (Mme S.)	Attaché principale
JEANDEL L.	Attaché
ESPINASSE (Mme M.-L.) ..	Attaché
BRENN A.	Attaché, ✻
JACOB A.	Attaché, ✻
MUR (Mme A.-M.)	Attaché
FRIZOL (Mlle E.)	Attaché
TRICAN J.	Attaché

PROFESSEURS HONORAIRES

LAUNOY L.	O ✻
FLEURY P.	O ✻
PICON M.	O ✻

PROFESSEURS

JANOT M.-M., O ✻, Membre de l'Institut	Pharmacie Galénique (T)
VALETTE G., O ✻	Pharmacodynamie (T)
PARIS R., ✻	Matière Médicale (T)
GUILLOT M., O ✻	Physique (T)
GAUTIER J.-A., O ✻	Chimie Organique (T)
LAMBIN (Mlle S.), ✻	Microbiologie (T)
RAOUL Y., ✻	Physiologie (T)
COURTOIS J. ✻	Chimie Biologique (T)
DOMANGE L., O ✻	Chimie Générale et Minérale (T)
TRUHAUT R., O ✻	Toxicologie (T)
MORETTE A., ✻	Hydrologie (T)

UNIV. LEIDEN BIBL.

CAVIER R., ✻	Parasitologie (T)
QUEVAUVILLER A., ✻	Hygiène et Education Sanitaire (T)
MOREAU R., ✻	Pharmacie Chimique (T)
GERMAN A.	Virologie et Sérologie (T)
PIETTE M., ✻	Biologie Sanguine, Hématalogie (T)
MALANGEAU P	Chimie Analytique (T)
GIRARD M., ✻	Biochimie Appliquée (T)
DILLEMANN G.	Législation, Déontologie et Histologie de la Pharmacie (T)
DEYSSON G.	Botanique (T)
MICHEL R.	Endocrinologie (T)
FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
RENAULT J.	Chimie Organique (T)
LE HIR A.	Pharmacie Galénique (T)
BOUDENE C.	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
DELAVEAU P.	Matière Médicale et Séméiologie
LARUELLE P.	Physique
ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie
MANGEOT A.	Pharmacie Galénique Industrielle
COHEN Y.	Pharmacodynamie
RENAULT H.	Physique
BOURDON R.	Chimie Analytique
REYNAUD P.	Pharmacie Chimique
LE MOAN R.	Toxicologie
POISSON J.	Pharmacie Galénique
LECLERC M.	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

PAOLETTI C.	Toxicologie
DESVIGNES A.	Cryptogamie et Technique Bactériologique
PERCHERON F.	Chimie Biologique
SAVEL J.	Biologie Animale
BORY M.	Microbiologie
MIOCQUE M.	Chimie organique

GUIGNARD J.L.	Botanique Générale
GOUNELLE J.C.	Physiologie
BINET P.	Biologie Animale
COMBET-FARNOUX C.	Chimie Organique
PLAT (Mme M.)	Législation et Déontologie Pharmaceutique
DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
ADOLPHE C.	Physique
GUERNET M.	Chimie Analytique et Bromatologie
DIDRY J.	Mathématiques
KHODADAD P.	Chimie Minérale et Minéralogie
PERLES R. (F.F.)	Chimie Biologique
YONGER J. (F.F.)	Chimie Analytique
RIVET J. (F.F.)	Chimie Générale et Minérale
HAZEBROUCQ (F.F.)	Physique
ETIENNE J. (F.F.)	Mathématiques
MESTRE J. (F.F.)	Botanique
BOURRINET P. (F.F.)	Hygiène Education Sanitaire
SOULEAU Ch. (F.F.)	Chimie Générale et Minérale

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

AGNERAY J.	T.P. Chimie Biologique 3e année
ASTIN C. (F.F.)	T.P. Physique 1re année
BARNIER (Mme S.)	Mathématiques
BERNARD (Mlle J.)	T.P. Microbiologie
BESANCON (F.F.)	Mathématiques
BIGET (Mme M.-P.)	Mathématiques
BLANC (Mme J.)	E.D. Chimie Organique
BONALY (Mme J.) (F.F.)	T.P. Botanique
BOURNIQUE (Mlle C.) (F.F.)	T.P. Physiologie Végétale 2e année
BRALET M. (F.F.)	T.P. Zoologie 1re année
BUNEAUX J.	Physiologie
CARLIER A.	C.E.S. Pharmacie Galénique Industrielle
CARRE D. (F.F.)	Chaire de Physique (Mathématiques)

CENAC (Mme J.) (F.F.)	C.E.S. Parasitologie Pharmaceutique et Technique
CHARPENTIER (Mme M.) ..	E.D. Chimie Minérale et Générale 1re année
CHOIX (Mlle M.)	T.P. Pharmacie Galénique 3e année
CLAIR (Mlle G.) (F.F.)	E.D. Essais des drogues végétales
COMPAGNON P. (F.F.)	E.D. Chimie Organique
DAGRON Ch.	E.D. Chimie Générale et Minérale 3e année
DAVY J. (F.F.)	C.E.S. Biochimie
DECAUDIN (Mlle M.-Th.) ..	T.P. Parasitologie 4e année
DELCOURT A. (F.F.)	T.P. Botanique
DREUX C.	C.E.S. Electrochimie Appliquée à l'Analyse
DUMANT (Mlle G.)	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Physico-Chimie)
DUCLOS J.-P.	Chaire de Chimie Organique
DUPONT (Mme Ch.)	T.P. Pharmacodynamie 4e année
ETIENNE G.	T.P. Pharmacie Galénique 2e et 3e années
FAURE (Mme L.) (F.F.)	E.D. Chimie Organique 1e année
FLEURY (Mlle S.)	E.D. Chimie Analytique Qualitative
FOGLIETTI (Mlle A.-M.) (F.F.)	T.P. Chimie Biologie 3e et 4e années
GAYRAL P. (F.F.)	Zoologie 1re année
GOURSAT (Mlle M.-J.) (F.F.)	E.D. Botanique 1re année
HAMON M.	T.P. Chimie Analytique Quantitative
HARISPE J.	T.P. Chimie Organique 2e année
HENRY J.	T.P. Chimie 4e année
HUBERT (Mme J.)	C.E.S. Bactériologie Parmaceutique et Technique
JULIEN R. (F.F.)	E.D. Chimie Générale et Minérale
JUND (Mlle Y.)	C.E.S. Microbiologie
LALEGERIE P. (F.F.)	C.E.S. Biochimie

LAROCHE J.	T.P. Physique 2e année
LEBŒUF M. (F.F.)	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
LEDUC (Mme Y.)	T.P. Chimie 4e année
LEGER (Mme N.)	Parasitologie 4e année
LELUC R.	T.P. Microbiologie 4e année
LEMONNIER A.	T.P. Chimie Analytique Quantitative
LEVILLAIN P.	E.D. Chimie Analytique
LIKFORMAN J.	E.D. Physique 1re année
LONGEVIALLE (Mlle M.)	E.D. Botanique 1re année
MACCARIO J. (F.F.)	Mathématiques 1re année
MAHUZIER G. (F.F.)	T.P. Chimie Analytique Qualitative
MANDEREAU J.	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
MARTIN FRERES H.	T.P. Chimie Minérale 1re année
MAUGUEN Y. (F.F.)	Chaire de Physique
MICHELET (Mlle A.) (F.F.)	E.D. Chimie Générale et Minérale 2e année
MORIN (Mlle H.)	C.E.S. Pharmacodynamie et Essais Biologiques des Médicaments
MOULIN P. (F.F.)	T.P. Physique 1re année
N'GUYEN PHU LICH (F.F.)	C.E.S. Toxicologie et Etudes Sanitaires
NOTTEGHEM (Mme J.) (F.F.)	T.P. Zoologie 1re année
PARIS M.	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Biologie)
PESTIS J.	T.P. Anatomie et Physiologie 2e année
POULLAIN P.	C.E.S. Hématologie
QUENEZ P. (F.F.)	Chaire de Chimie Générale et Minérale
RAYNAUD G.	Physiologie
ROBERT (Mme M.)	C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
RODIER N. (F.F.)	T.P. Physique 2e année
ROLLEN (Mlle A.)	T.P. Botanique 1re année
ROUSSELET F.	Biochimie Appliquée

ROUSSELET (Mlle R.) (F.F.)	T.P. Essais des Drogues Végétales
SEILLER (Mme M.) (F.F.)	C.E.S. Pharmacie Galénique et Industrielle
STRUPLER (Mlle N.)	T.P. Chimie Générale et Minérale 1re année
THUONG CONG TRIEU	T.P. Chimie Analytique Quantitative
TROUPEL (Mlle S.) (F.F.) ..	T.P. Chimie Analytique Qualitative
VIERFOND J.M. (F.F.)	E.D. Chimie Organique 1re et 2e années
VILLERS J. (F.F.)	Physique

BIBLIOTHEQUE

RUYSSEN (Mlle Y.)	Conservateur en chef, ✻
LAVAUD (Mlle S.)	Conservateur, ✻
DESGRIPPES (Mme A.)	Conservateur
BOUVRESSE (Mlle A.M.) ...	Bibliothécaire

Nous avons l'honneur d'exprimer à M. le Professeur E. AUJALEU, Directeur général de l'I.N.S.E.R.M., notre respectueux dévouement.

Nous avons aussi le devoir, en rappelant notre appartenance à l'I.N.S.E.R.M. au titre d'Attaché, de mentionner que l'élaboration de ce travail a fait partie de notre activité au sein de cet organisme de Recherche.

A MON PERE

Témoin de mes efforts,

Je voudrais, en m'inspirant de son courageux exemple, continuer une tradition de probité et d'inlassable intérêt aux malades.

A MA MERE

Toujours vigilante et attentive,

Je lui dois tout et je la remercie.

A MA SŒUR

Ma collaboratrice et fidèle compagne.

Sans elle, mes efforts eussent été vains, et je suis heureuse de lui en apporter ce témoignage.

A Monsieur le Professeur M. PIETTE

Nous nous inspirons en toutes circonstances de son enseignement magistral de l'hématologie à la Faculté de Pharmacie, qui a été la base de notre formation.

Nous gardons un fidèle souvenir des quatre fructueuses années d'Internat accomplies à la PITIÉ sous sa maîtrise.

Il a bien voulu approuver ce travail, accepter la Présidence de notre thèse et nous aider à la présenter.

Nous n'oublierons pas les attentions qu'il a eues pour les miens et le prions de trouver ici, ainsi que Madame PIETTE, l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M.L. GIRARD

Il nous est un devoir de rappeler que nous devons notre initiation en Biologie à son incomparable Cours Magistral de la Faculté de Pharmacie.

Il a honoré les miens de ses égards et son bienveillant accueil à LARIBOISIÈRE comptera parmi nos plus chers souvenirs.

Nous lui sommes obligée de s'être intéressé à ce travail et d'avoir accepté de le juger.

Qu'il nous permette de lui exprimer, ainsi qu'à Madame GIRARD, notre fidèle attachement et notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J. BOUSSER

Il nous a accueillie dans son beau service d'hématologie de l'HOTEL-DIEU, où il nous a incorporée au nombre de ses assistants et élèves.

Ce fut notre chance décisive et l'honneur de notre carrière. Nous lui devons tout et ce nous est un grand devoir, en le lui rappelant, de lui exprimer notre immense gratitude et notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur G. BILSKI-PASQUIER

Notre activité a été facilitée dans l'ambiance confiante et enthousiaste qu'il a créée autour de lui.

Il a encouragé nos efforts et nous a aidée de ses conseils avisés. Nous lui exprimons notre grand remerciement et toute notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur M. SAMAMA

Il est notre guide dans le Domaine de l'Hémostase où il est passé Maître.

Il nous a initiée à la recherche et a été le témoin vigilant de nos efforts, qu'il a efficacement encouragés.

Il nous a marqué en toutes circonstances son entière confiance et n'a pas cessé d'inspirer et de diriger notre activité.

Qu'il veuille accepter ce témoignage de vive reconnaissance.

A Madame le Docteur M.J. LARRIEU

Qui, par ses attributions à l'I.N.S.E.R.M., a été désignée personnellement pour guider et contrôler nos recherches.

Ses appréciations rigoureuses et ses précieuses directives ont marqué un tournant dans nos méthodes et dans l'expression de notre travail.

Qu'elle veuille trouver ici l'expression de notre reconnaissance et notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Agrégé R. ZITTOUN

En nous chargeant, sous sa direction, de la responsabilité du laboratoire de chimie hématologique, il nous a fait découvrir des horizons nouveaux.

Nous avons été émue de renouer avec lui, à l'HOTEL-DIEU, une chère et très ancienne relation familiale.

Qu'il veuille accepter ici l'expression de notre considération et de notre gratitude.

A Monsieur le Professeur M. CHEMLA

Qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire de la Faculté des Sciences d'Orsay, s'intéresser à notre travail et nous conseiller.

Nous lui adressons notre profond remerciement.

A notre Amie, le Docteur Jeanne YVER

Nous reconnaissons en sa personne une grande probité alliée à la modestie.

Elle nous a intelligemment aidée pour la présentation de ce travail.

Nous lui adressons notre affectueuse gratitude.

A Monsieur M. SUSCILLON

Qui nous a cordialement reçue dans son laboratoire du Centre d'Études Nucléaires de Grenoble où il nous a initiée à sa méthode de dosage ampérométrique du Facteur de stabilisation de la fibrine.

Nous lui exprimons, ainsi qu'à Monsieur le Professeur D. HOLLARD, notre profonde reconnaissance.

A Madame M.L. ESPINASSE

Attaché d'Administration Universitaire

Nous avons largement bénéficié de la justesse et de la clarté de sa documentation.

Qu'elle veuille bien croire à notre profonde reconnaissance.

A tous nos Amis de l'HOTEL-DIEU

A Monsieur A.J. LAURENT, Laboratoire Stago

Nous lui sommes reconnaissante d'avoir apprécié l'intérêt de ce travail et de nous y avoir encouragée.

INTRODUCTION

L'étude de la fibrinoformation au laboratoire s'est limitée, très longtemps, au dosage du fibrinogène et à la mesure du temps de thrombine.

— **Sur le plan biologique,** la découverte du facteur stabilisateur de la fibrine (FSF ou facteur XIII) d'une part, puis la mise en évidence des trois étapes de la fibrinoformation d'autre part, ont mis l'accent sur la nécessité de s'aider de techniques plus fines pour l'exploration de cette phase de la coagulation.

— **Sur le plan clinique,** la description de déficits congénitaux en facteur de stabilisation de la fibrine, la découverte tout à fait récente de dysfibrinogénémies (anomalies qualitatives du fibrinogène), puis l'étude du syndrome hémorragique des fibrinolyses spontanées ou thérapeutiques (induites par la Streptokinase) ont confirmé l'intérêt des méthodes analytiques d'étude de la fibrinoformation.

Le but de ce travail est d'apporter notre contribution au perfectionnement de l'exploration de la fibrinoformation, en examinant et en tentant d'améliorer les différentes techniques déjà proposées.

Nous rappellerons tout d'abord la physiologie de la fibrinoformation. Nous envisagerons ensuite l'analyse critique des principales méthodes utilisées pour l'étudier, à la lumière d'une expérimentation personnelle. Enfin nous rassemblerons dans un dernier chapitre différentes anomalies congénitales ou acquises de cette étape de la coagulation qui illustrent bien l'intérêt des techniques modernes d'exploration.

CHAPITRE I

RAPPEL SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE ET L'EXPLORATION DE LA FIBRINOFORMATION

I - PHYSIOLOGIE DE LA FIBRINOFORMATION

La fibrinoformation est la réaction de la coagulation la plus anciennement connue. Elle a fait l'objet depuis quelques années de travaux qui ont souligné son importance :

> troisième stade de la coagulation sanguine, après la thromboplastinoformation et la thrombinoformation, elle consiste à transformer le fibrinogène plasmatique en un caillot de fibrine.

A) LE FIBRINOGENE.

Le fibrinogène est le substrat de la réaction (11) : c'est la protéine la mieux connue de la coagulation du point de vue physico-chimique (64 - 72 - 132).

C'est un dimère (44 - 63) de poids moléculaire élevé (P.M. 340 000). Sa constante de sédimentation S 20 est de 7,7. Sa mobilité électrophorétique est intermédiaire entre les β et les γ globulines ; il appartient à la fraction euglobulinique du plasma.

1° ETUDE DE SA STRUCTURE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE.

Elle a permis de préciser sa configuration architecturale : la molécule est formée de 6 demi-sphères reliées entre elles par un filament protéïque, dont l'ensemble mesure 475 $\pm$ 25 $\mathring{A}$. Elle peut être schématisée de la façon suivante **(figure 1).**

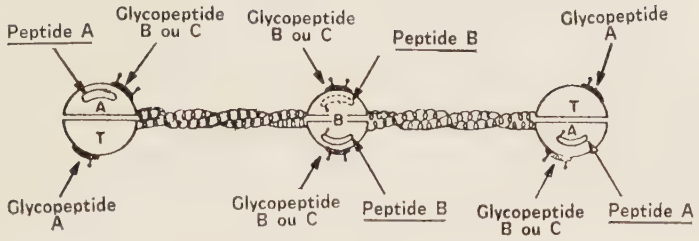


FIGURE 1 : STRUCTURE DU FIBRINOGENE.

2° ETUDE CHIMIQUE.

Elle montre que le fibrinogène est formé par 6 chaînes peptidiques symétriques 2 à 2 en ce qui concerne leur extrémité azote terminal (N terminal).

Les acides aminés azote terminal varient selon les espèces (24).

Pour le fibrinogène humain (15), la configuration est la suivante **(figure 2)** :

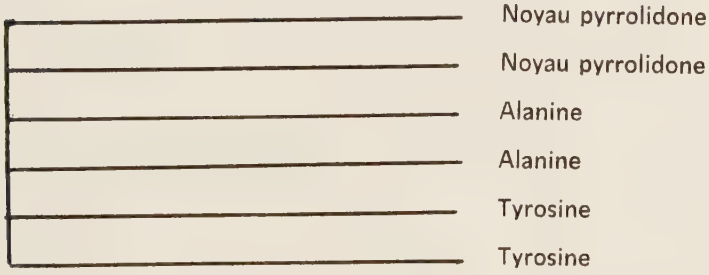


FIGURE 2 : CHAINES PEPTIDIQUES DU FIBRINOGENE.

Ces chaînes peptidiques sont reliées entre elles par des ponts disulfures S-S, au nombre de 28.

Un tiers seulement de ces chaînes est enroulé en hélice, le reste a une structure lâche.

Le fibrinogène contient, en outre, 1,5 à 3 % d'hydrates de carbone, sous forme de mannose, de galactose et d'acide sialique (20 - 30 - 31 - 126 - 127 - 172).

3° SYNTHESE DU FIBRINOGENE.

Elle est réalisée par la cellule hépatique (56 - 162). Sa demi-vie est de l'ordre de 2,5 à 3,5 jours ; aussi, selon MAC FARLANE, la reconstitution en un jour (4 - 14 - 78) varie chez l'homme entre 14,5 à 30,5 % de la totalité du fibrinogène sanguin.

B) LA FIBRINOFORMATION.

La transformation du fibrinogène en fibrine, protéine insoluble est plus complexe qu'on ne le croyait précédemment (27 - 81 - 92 - 93).

Elle se déroule en trois étapes, selon le schéma suivant **(tableau I) :**

— Action protéolytique de la thrombine libérant les fibrinopeptides A et B du fibrinogène, aboutissant au monomère de fibrine : monomérisation.

— Agrégation des monomères de fibrine : polymérisation.

— Transformation du polymère instable en polymère stable : stabilisation grâce à l'intervention du facteur XIII (FSF).

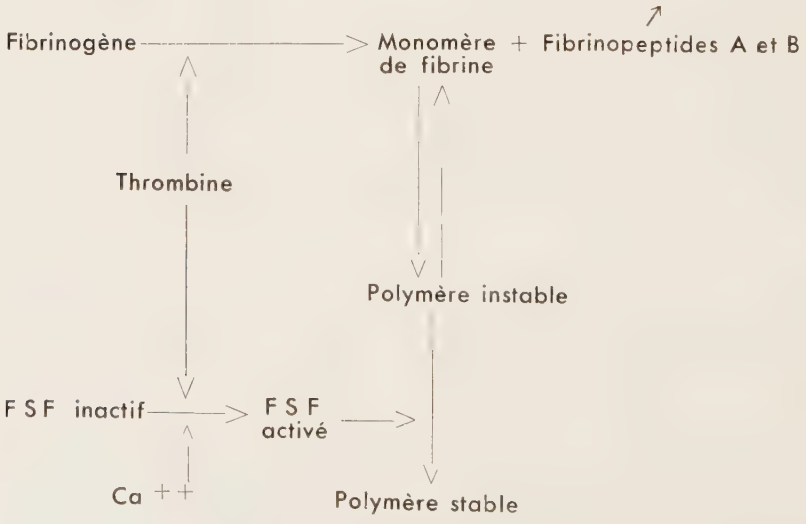


TABLEAU I : FIBRINOFORMATION.

1° ACTION PROTEOLYTIQUE DE LA THROMBINE.

Elle aboutit à la formation du monomère de fibrine et à l'élimination des fibrinopeptides A et B (7 - 8 - 96 - 124 - 161).

La thrombine exerce à l'égard du fibrinogène une hydrolyse préférentielle au niveau des liaisons arginine et glycine de quatre chaînes peptidiques. Ces liaisons privilégiées sont situées à faible distance de l'extrémité azote terminal de la chaîne.

Pour des raisons mal définies, les autres associations du même type échappent à cette hydrolyse.

Cette action protéolytique entraîne pour chaque molécule de fibrinogène la libération de 2 fibrinopeptides A et de 2 fibrinopeptides B (119 - 140).

En conséquence (15 - 16 - 85), nous trouvons pour chaque fibrinopeptide en position terminale l'arginine, tandis que, pour le monomère de fibrine (2), 4 molécules de glycine et 2 de tyrosine occupent les positions terminales.

Le schéma ci-dessous illustre cette réaction **(figure 3) :**

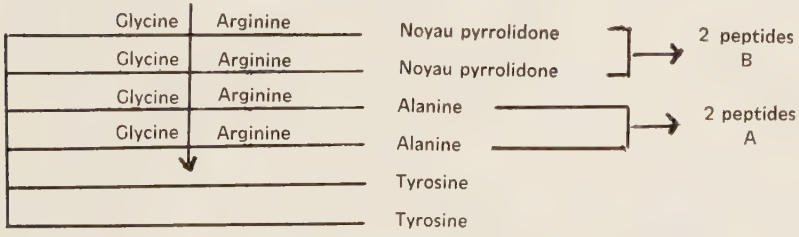


FIGURE 3 : ACTION PROTEOLYTIQUE DE LA THROMBINE SUR LE FIBRINOGENE.

Selon BLOMBACK, l'apparition de ces deux fibrinopeptides se fait à des vitesses différentes (41) :

— pour le fibrinopeptide A, elle se fait parallèlement à la formation de la fibrine ;

— pour le fibrinopeptide B, elle est d'abord lente, puis s'accélère.

Ces deux fibrinopeptides ont un poids moléculaire faible (12), respectivement 2 000 pour le peptide A, formé par 19 acides aminés (54 - 113) et 2 400 pour le peptide B, qui en comprend 21 (53 - 54 - 113).

L'action de la thrombine n'a donc permis de détacher qu'une très faible partie (3 %) de la molécule de fibrinogène.

D'autres enzymes sont capables d'induire une hydrolyse du fibrinogène. C'est le cas par exemple de la REPTILASE (*) ou venin de Bothrops Atrox, qui ne libère que les fibrinopeptides A. La formation d'un caillot est toutefois possible mais le mode de polymérisation sera différent.

Pour certains auteurs, cette réaction conduirait également à la libération de glucides (29 - 150), cependant des travaux récents de MESTER (129) vont à l'encontre de cette dernière hypothèse.

2° AGREGATION DES MONOMERES DE FIBRINE (48).

Le rejet des fibrinopeptides A et B permet l'agrégation des monomères de fibrine. Elle est liée directement à la perte des charges électro-statiques négatives élevées, en rapport avec le contenu en acides aspartique et glutamique des peptides. L'agrégation se fait d'abord dans le sens longitudinal, puis dans le sens transversal par des liaisons hydrogène entre l'histidine (receveur) et la tyrosine (donneur).

Dans le cas particulier de la REPTILASE, la polymérisation est différente et se fait bout à bout.

A ce stade, la réaction est réversible (38) car on est en présence de liaisons hydrogène très instables, qui ne dépendent que des conditions physico-chimiques du milieu (42 - 43) (pH - force ionique). Aussi tous les corps capables de rompre les liaisons hydrogène (urée 5 M ou acide monochloracétique à 1 %) peuvent dissocier le caillot par retour au stade de monomères de fibrine (106 - 171 - 178).

(*)REPTILASE - réactif « R » - Fraction thrombinique du venin de Bothrops Atrox.

3° TRANSFORMATION DU POLYMERE INSTABLE EN POLYMERE STABLE PAR L'INTERVENTION DU FACTEUR DE STABILISATION DE LA FIBRINE (157).

La transformation de fibrine soluble en fibrine insoluble ou fibrine I nécessite la présence de FSF ou facteur XIII (50). Il est préalablement activé, au cours de la coagulation, par la thrombine en présence de calcium ionisé.

L'existence du FSF est longtemps passée inaperçue du fait de sa liaison étroite in vitro avec le fibrinogène.

LAKI et LORAND ont remarqué les premiers, en 1948, qu'un caillot de fibrinogène purifié coagulé par la thrombine était soluble dans l'urée 5 M (fibrine soluble ou fibrine S) (93 bis). A l'inverse, un caillot formé à partir de plasma résiste à la dissolution dans ces mêmes conditions. Il est doué d'une plus grande résistance mécanique (fibrine insoluble ou fibrine I). Depuis, les travaux de LORAND d'une part et de LOEWY d'autre part ont précisé les propriétés de ce facteur et son mode d'action (103).

C'est une protéine de poids moléculaire élevé (35) : 350 000 $\pm$ 10 000. En solution, elle se scinde spontanément en sous-unités de poids moléculaire 110 000. Sa constante de sédimentation S 20 est de 7,2.

Elle renferme des groupements SH (22) qui seraient son centre actif. En effet, certaines substances, en bloquant ces groupements, inactivent le FSF. Ses caractères sont donc voisins de ceux du fibrinogène, ce qui explique qu'il est très difficile de séparer ces deux composés (104 - 107).

Le facteur XIII présent dans le plasma et sur les plaquettes (87 - 118) sous forme de précurseur inactif est transformé en enzyme active sous l'influence de la thrombine (21 - 22 - 112) en présence de calcium (89). La thrombine n'agit ici qu'en activant le FSF, mais elle n'intervient pas elle-même dans la polymérisation des monomères. La même activation peut être réalisée par la REPTILASE.

Le FSF, appelé encore fibrinase, est une enzyme capable d'insolubiliser 11.000 fois son poids de fibrine. Son mécanisme d'action a été longtemps discuté (105 - 109 - 110).

Cependant, l'ensemble des auteurs s'accorde pour attribuer cette formation de liaisons interpeptidiques à un phénomène de transamidation avec libération d'ammoniaque (107).

Pour LORAND, ce sont les groupements amide de la glutamine et les groupements epsilon animé de la lysine qui interviendraient (115), alors que pour LAKI, la réaction se ferait entre les glycopeptides et certains groupements aminés de l'agrégat de fibrine (91 - 128). Quoi qu'il en soit, la présence de FSF est indispensable à la formation d'un caillot stable, permettant une hémostase normale. L'importance du facteur XIII dans le mécanisme physiologique de l'hémostase est démontrée par la précocité et la gravité du syndrome hémorragique observé au cours des déficits congénitaux. Cependant, la quantité de FSF nécessaire à l'obtention d'un caillot de fibrine insoluble dans l'urée est très faible, de l'ordre de 1 % de la normale.

C) INHIBITEURS DE LA FIBRINOFORMATION :

Les inhibiteurs de la fibrinoformation (40 - 61 - 62) ou antithrombines, classés par SEEGERS, sont numérotés de I à VI. Ils comprennent les inhibiteurs physiologiques (I - II - III - IV), et les inhibiteurs pathologiques (V - VI). Parmi eux on distingue les antithrombines vraies à action antiprotéolytique et les antipolymérases.

1°) INHIBITEURS PHYSIOLOGIQUES :

a) ANTITHROMBINE I.

C'est en réalité le fibrinogène (25 - 86 - 176).

On a montré que lorsque le caillot se formait, la fibrine était capable d'adsorber à sa surface et dans ses mailles des quantités très importantes de thrombine. Le fibrinogène contenu dans 1 ml de plasma normal pourrait adsorber 1 000 à 2 000 unités de thrombine. Cette adsorption, immédiate, est suivie de la libération de la thrombine dans le sérum au moment où cette dernière pourra être neutralisée par l'antithrombine III.

b) ANTITHROMBINE II.

C'est le cofacteur de l'héparine (13 - 23 - 26 - 144).

L'héparine est une des substances antithrombiques les plus actives, mais elle n'agit que lorsqu'elle est combinée avec un cofacteur plasmatique. Elle empêche l'action protéolytique de la thrombine, mais n'a aucune action sur la polymérisation.

L'étude de ce cofacteur a permis de préciser ses caractères. Il est :

- Détruit par chauffage à 60° C pendant 10 minutes.
- Absorbé par le phosphate de calcium $(PO_4)_2Ca_3$, mais non par le sulfate de baryum, SO_4 Ba.
- Précipité par le sulfate d'ammonium à saturation.
- Soluble dans l'éther.

c) ANTITHROMBINE III (73 - 74 - 84).

Elle est de type progressif ; elle a longtemps été confondue avec le cofacteur de l'héparine, mais il apparait à l'heure actuelle que l'activité inhibitrice du plasma (antithrombines II et III) est supportée par plusieurs protéines dont le mode d'action sur la thrombine est différent.

L'ultra-centrifugation du sérum montre que ces deux activités, celle de l'antithrombine et celle du cofacteur de l'héparine peuvent être partiellement dissociées.

Par ailleurs, la précipitation de l'α_2 macroglobuline du sérum par les anticorps spécifiques prouve qu'une partie importante de l'activité antithrombique physiologique est bien due à cette protéine, qui est différente du cofacteur de l'héparine (163 - 164).

Ainsi l'hypothèse la plus vraisemblable est que l'activité antithrombique progressive du plasma est supportée par plusieurs molécules différentes :

- L'une est l'antithrombine III.
- L'autre serait le cofacteur de l'héparine.

L'antithrombine III est très puissante, puisque 1 ml de plasma ou de sérum est capable de neutraliser 2 000 unités

de thrombine. Il semblerait que le sérum en soit moins riche que le plasma, car elle pourrait être consommée, tout au moins partiellement, au fur et à mesure qu'elle neutralise la thrombine.

d) ANTITHROMBINE IV.

Elle agit comme l'antithrombine III, mais son action se limite à la neutralisation de la thrombine formée à partir de la prothrombine au cours de la coagulation.

2°) INHIBITEURS PATHOLOGIQUES.

Ce sont l'antithrombine V et l'antithrombine VI.

a) ANTITHROMBINE V (173).

Elle est rencontrée dans certains cas de polyarthrite chronique évolutive ou de myélome (177) ; son action est du type anti-polymérase.

b) ANTITHROMBINE VI (88).

Elle a été décrite par NIEWIAROWSKI. Elle est constituée par les produits de dégradation du fibrinogène obtenus par l'action d'enzymes protéolytiques sur le fibrinogène. Elle possèderait à la fois une action antithrombique vraie et une action antipolymérase. On la retrouve en très petite quantité dans le sang des individus normaux. En effet, certains auteurs ont admis que le fibrinogène serait physiologiquement détruit au niveau du rein par l'urokinase et que les produits de dégradation seraient retrouvés dans le sang de la veine rénale (179). De ce fait, l'antithrombine VI pourrait être considérée comme physiologique (35), cependant elle n'est rencontrée qu'à des taux très bas, qui ne peuvent interférer avec l'hémostase normale.

c) INHIBITEURS DU FSF.

Ils sont très rarement rencontrés en pathologie (100 - 111). Cependant, on connaît de très nombreux inhibiteurs artificiels du FSF (37 - 69 - 165), dont l'emploi permet la mesure de son activité.

II - EXPLORATION DE LA FIBRINOFORMATION

Les anomalies de la troisième phase de la coagulation peuvent exister à différents stades :

1° Anomalies qualitatives ou quantitatives du fibrinogène : alors que les premières sont exceptionnelles, les secondes sont relativement fréquentes.

2° Diminution importante du taux du facteur XIII ou FSF ou facteur de stabilisation de la fibrine, qui est extrêmement rare.

3° Présence d'inhibiteurs de la troisième phase proprement dite, appelés antithrombines. Il s'agit :

— soit d'antithrombines vraies, qui inhibent l'action protéolytique de la thrombine ;

— soit d'antipolymérases, qui s'unissent aux monomères de fibrine, en les empêchant de se polymériser ;

— soit d'inhibiteurs à action mixte.

A) DOSAGE DU FIBRINOGENE.

Le dosage du fibrinogène est le premier examen à effectuer pour explorer la fibrinoformation.

Le taux normal est de 3 g par litre à 4,5 g par litre (143).
Le dosage se fait :

— soit par pesée après coagulation du fibrinogène par la thrombine calcique ;

— soit par colorimétrie par le réactif du biuret, après avoir isolé le fibrinogène par un des trois procédés suivants :

- Précipitation par le sulfate d'ammonium à 25 % de saturation.
- Coagulation par la thrombine.
- Précipitation sous l'action de la chaleur (56° C pendant 20 minutes).

— soit encore par détermination du temps de thrombine dans des conditions très particulières (36).

L'emploi d'une solution de thrombine très concentrée et d'une dilution convenable de plasma permet d'éliminer l'influence éventuelle des antithrombines.

B) THROMBOELASTOGRAPHIE.

Le thromboélastogramme explore la solidité mécanique, étroitement dépendante de la structuration du caillot (123).

On l'effectuera sur un plasma riche en plaquettes, l'écartement des deux branches du diapason est fonction :

- Du fibrinogène (quantité et qualité).
- Du nombre des plaquettes.
- Du taux de FSF.

On le pratiquera également sur le plasma dépourvu de plaquettes : l'amplitude du tracé dépendra alors uniquement des taux de fibrinogène et de FSF.

C) TEMPS DE THROMBINE (45).

Le temps de thrombine est le temps de coagulation du plasma en présence d'une quantité déterminée de thrombine, étudié parallèlement à un témoin. Les allongements du temps de thrombine dénotent :

— soit un défaut qualitatif du fibrinogène (4 cas décrits) ;

— soit une diminution **importante** du taux de fibrinogène : il faut en effet que le taux soit inférieur à 1 g par litre pour influencer le temps de thrombine ;

— soit une augmentation importante du taux de fibrinogène : ce dernier constitue, en effet, comme nous l'avons vu, l'antithrombine I de SEEGERS. Une simple dilution du plasma, ramenant le fibrinogène à un taux normal, corrige le trouble ;

— soit une activité antithrombique anormale :

- Antithrombine vraie, inhibant l'action protéolytique de la thrombine.

ou

- Antipolymérase.

On éliminera d'emblée l'éventualité d'une héparinothérapie car cette médication à action antithrombique très puissante est facilement neutralisée par le bleu de toluidine ou le sulfate de protamine.

Toutes les antithrombines, à l'exception du fibrinogène, se retrouvent dans le sérum du malade, provoquant l'allongement du temps de thrombine d'un plasma témoin.

Pour doser l'antithrombine III progressive, on fait incuber le sérum du malade avec une dose déterminée de thrombine et l'on étudie à intervalles réguliers, dans le mélange, la baisse d'activité de la thrombine sur une solution de fibrinogène.

Plus l'antithrombine est puissante, plus l'inactivation de la thrombine est importante.

D) ETUDE PHOTOMETRIQUE DE LA POLYMERISATION DE LA FIBRINE.

Après addition de thrombine à une dilution déterminée de plasma, on suit par enregistrement spectrophotométrique à une longueur d'onde donnée les variations cinétiques de la densité optique.

Après un temps de latence initial, qui correspond à la phase de monomérisation, la densité optique augmente très rapidement, traduisant la phase de polymérisation proprement dite, puis atteint un plateau assimilé à la stabilisation du caillot.

Dans des conditions bien déterminées de pH et de force ionique, et en l'absence de dysfibrinogénémie, il existe une relation linéaire entre le taux de fibrinogène et la densité optique maximale.

Les anomalies se traduisent par un allongement de la phase de latence et une phase de polymérisation « d'aspect étiré ». Elles sont dues :

— soit à une antithrombine vraie : la production de monomères étant défectueuse, la polymérisation sera, de ce fait, anormale ;

— soit à un trouble de la polymérisation proprement dite, dû soit à une dysfibrinogénémie (les monomères de mauvaise qualité ne peuvent pas se polymériser), soit à certaines substances qui s'unissent aux monomères et les empêchent de se polymériser, tels les produits de dégradation du fibrinogène par la plasmine seuls les produits de haut poids moléculaire sont actifs, les composés de petite taille ne possèdent pas cette action.)

E) ETUDE DES ANTITHROMBINES.

Des techniques moins courantes ont pour but de différencier les antithrombines.

1° MISE EN EVIDENCE D'UNE ANTITHROMBINE VRAIE.

La thrombine a une action protéolytique vis-à-vis du fibrinogène, mais également vis-à-vis de substrats synthétiques, tels l'ester méthylique de la Benzoyl-arginine ou B.A.M.E. qui est scindé en Benzoyl-arginine et en alcool méthylique. La transformation de ce substrat synthétique peut être suivie au spectrophotomètre par une simple variation de densité optique à une longueur d'onde déterminée.

Si la thrombine est au préalable neutralisée par une antithrombine vraie, l'action sur le substrat synthétique sera diminuée d'autant plus que l'antithrombine sera plus puissante.

2° MISE EN EVIDENCE D'UNE ANTIPOLYMERASE.

L'action antipolymérase sera recherchée sur des monomères normaux de fibrine dont on étudiera la polymérisation en présence de plasma témoin ou pathologique.

F) DETERMINATION DU FACTEUR DE STABILISATION DE LA FIBRINE.

1° DEFICIT TOTAL (19 - 149).

Déjà l'allure du thromboélastogramme oriente vers cette anomalie. L'amplitude maximale est faible, compte tenu du taux de fibrinogène et du nombre des plaquettes. De plus, les branches se rapprochent rapidement, alors qu'il ne s'agit pas d'une fibrinolyse. Mais l'examen permettant d'affirmer le déficit est, en fait, l'épreuve de solubilité, dans l'urée 5 M ou l'acide monochloracétique à 1 %, du caillot plasmatique obtenu par coagulation avec de la thrombine calcique. En effet, dans ce cas, le caillot est formé par des agrégats de monomères réunis par des liaisons hydrogène rompues par de tels solvants.

2° DEFICIT PARTIEL.

Le caillot restera insoluble dans les solvants appropriés. Un dosage quantitatif de FSF s'impose alors : les techniques sont délicates et aucune n'est actuellement satisfaisante. La méthode de référence consiste à déterminer la dilution de plasma à apporter à du fibrinogène dépourvu de FSF pour rendre son caillot insoluble. Cependant l'obtention du fibrinogène dépourvu de FSF est délicate à réaliser et nécessite une chromatographie sur Diethylaminoéthyl-cellulose dans des conditions particulières.

D'autres techniques ont été proposées, basées sur la présence de groupements — SH libres dans le FSF (contrairement au fibrinogène, qui n'en contient pas) :

— soit après isolement du complexe fibrinogène FSF : par des méthodes très sensibles, potentiométriques (28), on dose les groupements SH, dont le taux dépendra de la quantité de FSF présente ;

— soit par détermination de la quantité minimale d'acide monoiodacétique à apporter au plasma pour bloquer tous les groupements SH (133), induisant ainsi la solubilité du caillot dans les solvants appropriés.

G) IMMUNO-ELECTROPHORESE DU FIBRINOGENE.

Parfois on complètera cette étude par une immuno-électrophorèse du fibrinogène, afin d'en étudier les caractères immunologiques.

3° PATHOLOGIE DE LA FIBRINOFORMATION.

La pathologie de la fibrinoformation a trait aux différentes anomalies rencontrées au cours de chacun des stades de cette importante étape de la coagulation.

A) ANOMALIES AU NIVEAU DU SUBSTRAT.

Alors que les variations quantitatives (116) du fibrinogène sont relativement fréquentes, les anomalies qualitatives, ou dysfibrinogénémies sont très rares (4 cas décrits, le 5e ayant été découvert dans notre laboratoire du service du Professeur BOUSSER à l'HOTEL-DIEU de PARIS).

1° DIMINUTIONS DU TAUX DE FIBRINOGENE.

Elles se traduisent biologiquement par une réduction de l'amplitude maximale du thromboélastogramme et, si le déficit est important, par un allongement du temps de thrombine et une diminution du volume et de la solidité du caillot.

Seules les hypofibrinogénémies inférieures à 1 g par litre peuvent comporter un risque hémorragique franc.

Les causes sont variables : il peut s'agir d'un défaut de synthèse au niveau de la cellule hépatique ou d'une destruction exagérée de la fibrine.

a) DEFAUT DE SYNTHESE DU FIBRINOGENE AU NIVEAU DE LA CELLULE HEPATIQUE.

α) *Anomalies acquises.*

Elles sont secondaires à des lésions graves du parenchyme hépatique (cirrhose ou ictère grave) : dans ce cas l'hypofibrinémie est associée à un trouble du complexe prothrombinique.

β) *Anomalies congénitales.*

Afibrinogénémie congénitale (17 - 65 - 94) :

Le déficit total et isolé est une anomalie rare de la coagulation (40 cas connus), atteignant les deux sexes et transmise selon le mode autosomal recessif (34).

Les manifestations hémorragiques (33) apparaissent presque toujours dès la naissance, sous forme d'hémorragies ombilicales incoercibles. Paradoxalement, la tendance au saignement spontané est souvent modérée. Les règles sont habituellement normales chez les filles. Le caractère provoqué des hémorragies a été souligné.

Le traitement consiste en des transfusions de fibrinogène humain administré à titre curatif au cours des épisodes hémorragiques graves, ou à titre préventif avant toute intervention chirurgicale.

L'effet thérapeutique clinique persiste deux à trois semaines, alors que la correction des tests biologiques ne dure que 72 heures. La présence d'anticorps dirigés contre le fibrinogène chez les malades polytransfusés n'a pas été signalée.

Hypofibrinogénémie congénitale (121).

C'est une maladie transmise selon le mode dominant, non liée au sexe et aussi rare que la précédente. Les premières manifestations hémorragiques sont souvent tardives et la maladie n'est révélée le plus souvent qu'à l'occasion d'une intervention chirurgicale.

Le traitement est substitutif. Le taux minimum de fibrinogène plasmatique pour assurer l'hémostase est voisin de 1 g par litre. La durée d'efficacité de la thérapeutique est basée sur le turnover du fibrinogène injecté, qui disparaît au rythme de 20 % environ par jour.

b) DESTRUCTION EXAGEREE DU FIBRINOGENE.

Soit par fibrinolyse, soit par coagulation intra-vasculaire.

α) *Fibrinolyses.*

Elles surviennent principalement :

— en chirurgie majeure, chirurgie thoracique, utérine ou cardiaque, lors des anastomoses porto-cave, car ces organes sont riches en kinases ; en effet, celles-ci transforment un proactivateur, inactif dans le sang, en un activateur, qui va agir sur le plasminogène, aboutissant à la plasmine, d'où fibrinolyse ;

— au cours de cancers métastatiques de la prostate ou au cours de cirrhoses ;

— au cours d'accidents obstétricaux ;

— beaucoup plus rarement dans les hémopathies (leucémies à promyélocytes, maladie de Vaquez) ;

- La forme aiguë est caractérisée par un saignement en nappe. Biologiquement, le sang donne un caillot se lysant très rapidement, ou il ne coagule pas. Dans ce cas, l'apport de fibrinogène entraîne la formation d'un coagulum se dissolvant rapidement, traduisant ainsi l'activité lytique résiduelle.

- La forme chronique est caractérisée par des taches ecchymotiques de couleur lie de vin et des hémorragies aux points de piqûre. La lyse du caillot sanguin et la lyse du caillot des euglobulines objectivent le trouble.

- Les formes latentes sont découvertes au cours d'examens systématiques.

Le traitement consiste en l'administration parentérale d'inhibiteur de KUNITZ (Iniprol) qui agit en s'opposant à la plasmine, ou d'inhibiteurs du type acide epsilon aminocaproïque, qui empêchent l'activation du plasminogène, l'administration pouvant alors être faite par voie parentérale ou orale.

β) *Coagulations intra-vasculaires.*

Elles surviennent principalement lors de l'activation de la coagulation par des substances thromboplastiniques déversées dans le torrent circulatoire parallèlement à l'existence d'un état de choc important avec mise hors jeu du système réticulo-endothélial (169), qui débarrasse normalement l'organisme des facteurs de coagulation activés.

Elles se rencontrent au cours de septicémies à bacilles gram négatif, de septicémies à perfringens, d'accidents post-transfusionnels ou obstétricaux (152) (rétention d'œuf mort, hématome retroplacentaire).

Le diagnostic différentiel avec les fibrinolyses est délicat car les coagulations intra-vasculaires sont souvent associées à une fibrinolyse secondaire réactionnelle. Le principal argument en faveur d'une coagulation intra-vasculaire est l'apparition brutale d'une thrombopénie par consommation des plaquettes.

Dans ce dernier cas, l'héparinisation est la thérapeutique indiquée.

2° AUGMENTATION DU TAUX DE FIBRINOGENE.

Les élévations du taux de fibrinogène sont évocatrices de syndrome inflammatoire : rhumatisme articulaire aigu, tuberculose, pneumonie, cancer... Biologiquement, le trouble se traduit par une augmentation de l'amplitude maximale du thromboélastogramme, et, par un allongement du temps de thrombine dans les cas d'hyperfibrinémie très importante, l'allongement est alors corrigé par dilution du plasma.

3° DYSFIBRINOGENEMIES.

Elles témoignent d'une anomalie qualitative du fibrinogène.

Quatre cas de dysfibrinogénémie congénitale, transmis selon le mode dominant, ont été décrits par :

- DETTORI et IMPERATO, en 1958 en Italie.
- MENACHE, en 1964 en France.
- BECK, CHARACHE et JACKSON, en 1965 aux Etats-Unis.
- DUCKERT, VON FELTEN et FRICK, en 1966 en Suisse.

La tendance au saignement est nulle ou modérée. Le laboratoire objective le trouble par :

— une anomalie de la structuration du caillot en tube et en thrombodynamographie ;

— un abaissement du taux de fibrinogène lorsque la détermination est effectuée par la mesure du temps de coagulation par la thrombine, en contradiction avec une teneur normale lorsque l'on pratique un dosage chimique ou pondéral ;

— un allongement important du temps de thrombine, partiellement corrigé par le calcium ;

— De plus, dans le cas de MENACHE, le fibrinogène du malade inhibe la coagulation du fibrinogène d'un plasma normal par la thrombine.

L'immuno-électrophorèse ne montre que des anomalies très discrètes.

B) ANOMALIES DUES A LA PRESENCE D'ANTITHROMBINES.

L'apparition d'une antithrombine pathologique au cours de certaines affections est très fréquente.

1° ANTITHROMBINE V.

Elle se voit principalement dans certaines affections telles que la polyarthrite chronique évolutive ou le myélome. D'ailleurs la protéine anormale IgG isolée a pu reproduire le trouble in vitro sur du plasma témoin.

2° ANTITHROMBINE VI.

Découverte par NIEWIAROWSKI, elle est constituée, comme nous l'avons déjà dit, par des produits de dégradation du fibrinogène sous l'action de la plasmine, aboutissant à des fragments inhibant la polymérisation.

Des études par immuno-électrophorèse, qui ont été faites, il ressort que seuls les produits de dégradation de poids moléculaire élevé étaient antithrombiques.

C) DEFICIT EN FSF.

La maladie congénitale a été décrite la première fois par DUCKERT (38 bis).

Cette maladie autosomale, transmise selon le mode récessif, est révélée très tôt par des hémorragies du cordon ombilical, de volumineux hématomes et des hémorragies de section. La survenue d'hémorragies cérébro-méningées paraît fréquente (19 - 52 - 82 - 114 - 141).

Cette affection associe curieusement à la tendance hémorragique un retard important de la cicatrisation des plaies. Le diagnostic repose essentiellement sur l'épreuve de solubilité du caillot dans les solutions d'urée 5 M et sur l'aspect du thromboélastrogramme, qui montre une diminution de l'amplitude maximale et un rapprochement exagéré des deux branches de l'image en diapason.

Le traitement consiste en des transfusions de plasma et de fibrinogène.

La demi-vie du FSF serait de l'ordre de trois jours (83). Des déficits moins importants seraient rencontrés au cours de coagulations intra-vasculaires massives, par adsorption du facteur XIII sur le coagulum (137).

CHAPITRE II

LA FIBRINOFORMATION
ETUDE EXPERIMENTALE
DES METHODES UTILISEES

DOSAGE DU FIBRINOGENE

ETUDE COMPAREE DES DIFFERENTES TECHNIQUES

Nous avons vu (chapitre I) qu'il existait plusieurs techniques de dosage du fibrinogène (6 - 46 - 142).

On peut les classer en quatre groupes :

1° De nombreuses méthodes sont basées sur la transformation du fibrinogène en fibrine, que l'on évalue par différentes techniques :

— opacimétrie ;

— gravimétrie ;

— colorimétrie par le réactif du biuret.

2° D'autres auteurs préconisent l'isolement du fibrinogène :

— soit par précipitation sélective par le sulfate d'ammonium à 25 % de saturation, puis détermination par le réactif du biuret ;

— soit par précipitation par la chaleur à 56° C et évaluation du précipité.

3° Certaines techniques sont basées sur la mesure du temps de coagulation d'un plasma fortement dilué par une solution concentrée de thrombine. En effet, dans ces conditions, « le temps de thrombine » est peu influencé par les antithrombines physiologiques ou pathologiques. Il est par contre directement proportionnel à la richesse du milieu en fibrinogène.

4° Enfin les méthodes immunologiques sont surtout intéressantes pour mettre en évidence des traces de fibrinogène, en particulier dans les cas d'afibrinogénémie congénitale (154).

Les résultats obtenus par ces différentes méthodes sont, le plus souvent, concordants.

Toutefois, l'attention a été récemment attirée par l'existence, dans certains cas pathologiques, de taux variables selon la technique choisie. Ces désaccords traduisent en réalité une anomalie parfois méconnue de la fibrinoformation.

Dans ces cas particuliers, l'interprétation doit être restrictive et ne tenir compte que du pourcentage du fibrinogène « physiologiquement actif », déterminé par la méthode chronométrique plutôt que de la quantité réelle du fibrinogène plasmatique.

Au laboratoire, nous avons utilisé quatre méthodes appartenant à chacun des groupes énumérés ci-dessus :

A) METHODE DU PREMIER GROUPE.

TECHNIQUE GRAVIMETRIQUE (147).

Elle consiste en une coagulation pendant 30 minutes à 37° C de 5 ml de plasma par une solution de chlorure de calcium M/300 dans du sérum physiologique en présence de 15 unités internationales de thrombine. Le pâton de fibrine est isolé, séché, puis pesé.

B) METHODES DU DEUXIEME GROUPE.

1° TECHNIQUE PAR PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM (5).

Elle consiste en l'isolement du fibrinogène à partir de 1 ml de plasma par précipitation par du sulfate d'ammonium à 25 % de saturation. Le fibrinogène ainsi séparé est dissous dans 9,5 ml de soude à 3 %, puis traité par 0,25 ml de sulfate de cuivre à 20 % dans de l'acide sulfurique 0,4 N (réaction du biuret).

La courbe d'étalonnage est établie à partir de plasmas témoins dont le taux de fibrinogène avait été préalablement déterminé par une méthode gravimétrique de façon à pouvoir comparer plus valablement les résultats obtenus par l'une et l'autre méthode.

2° TECHNIQUE PAR PRECIPITATION A 56° C (57).

Le chauffage du plasma pendant 20 minutes à 56° C précipite le fibrinogène ; la suspension est centrifugée dans des tubes gradués type hématocrite. La hauteur du culot est proportionnelle à la teneur en fibrinogène. La courbe d'étalonnage est effectuée à partir de plasmas témoins ayant un taux de fibrinogène connu.

C) METHODE DU TROISIEME GROUPE.

TECHNIQUE MODIFIEE DE VON CLAUSS (175).

Le temps de coagulation de 0,2 ml d'une dilution convenable de plasma après addition de 80 unités internationales de thrombine, sous un volume de 0,2 ml, est mesuré avec précision en s'aidant d'un crochet.

La dilution du plasma est habituellement pratiquée au 1/10 pour des taux de fibrinogène compris entre 2 g et 4 g/litre.

Elle est augmentée ou diminuée dans les cas d'hyper ou d'hypofibrinémie. Il existe une relation bilogarithmique entre le temps de coagulation et le taux de fibrinogène.

Pour l'ensemble des techniques, le prélèvement de sang est effectué dans les conditions suivantes : 9 parties de sang sont recueillies sur une partie d'une solution aqueuse de citrate de sodium à 10 %.

Dans les cas où l'activité fibrinolytique risque d'être augmentée, il est indispensable d'ajouter aux 10 ml de sang citraté, dès le prélèvement, 0,1 ml d'une solution d'inhibiteur de KUNITZ (*) à 200 000 Unités Schwert et Takenaka par ml.

(*) Iniprol : Laboratoire CHOAY - Paris.

TEMPS DE THROMBINE ET TEMPS DE REPTILASE

ANALYSE DES ALLONGEMENTS DU TEMPS DE THROMBINE AU COURS DES DIFFERENTS TROUBLES DE LA FIBRINOFORMATION

L'étude de la fibrinoformation a été longtemps limitée au dosage du fibrinogène et à la mesure du temps de thrombine, méthode simple et globale influencée seulement par les deux premières phases de la transformation du fibrinogène en fibrine (45). La thrombine, enzyme protéolytique, détache du fibrinogène les fibrino-peptides A et B, permettant aux monomères de fibrine de s'agréger pour former un gel ou coagulum.

Les résultats obtenus en présence de thrombine ou de REPTILASE (venin de Bothrops Atrox) ont été comparés. Cette dernière enzyme exerce une action différente de la thrombine car elle ne détache que les fibrinopeptides A et non les fibrinopeptides B. En outre, contrairement à la thrombine, la REPTILASE est insensible à l'action de l'héparine, inhibiteur puissant de l'action protéolytique de la thrombine en présence d'un co-facteur plasmatique.

A) TEMPS DE THROMBINE.

C'est le temps de coagulation d'un plasma en présence d'une quantité constante de thrombine.

La technique consiste à déterminer, au bain-marie à 37° C, la vitesse de coagulation de 0,2 ml de plasma additionné de 0,2 ml de thrombine titrant 2,5 unités internationales/ml.

Dans de telles conditions, le temps de thrombine d'un plasma témoin est voisin de 20 secondes.

B) TEMPS DE REPTILASE.

Il correspond à la mesure du temps de coagulation à 37° C de 0,2 ml de plasma additionné de 0,2 ml de solution de REPTILASE convenablement dilué de façon à obtenir un temps compris entre 20 et 30 secondes pour le plasma témoin.

Un allongement du temps de thrombine ou du temps de REPTILASE dénotera un trouble des deux premiers temps de la fibrinoformation :

- Défaut de monomérisation, provenant d'une anomalie au niveau du substrat ou d'une action anti-estérasique.
- Défaut de l'agrégation des monomères, les monomères étant solubles on n'assistera pas, en cas de blocage à ce stade, à une coagulation du milieu, ce qui se traduira par un allongement du temps de thrombine ou du temps de REPTILASE.

Remarque : Les déficits en FSF n'entraînent pas un allongement du temps de thrombine.

COURBE DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE

Nous avons étudié parallèlement les variations cinétiques de la densité optique, à une longueur d'onde de 350 mμ d'un plasma ou d'une solution de fibrinogène après addition de thrombine ou de REPTILASE.

Cette méthode permet de suivre la transformation du fibrinogène en agrégats de fibrine.

A) TECHNIQUE DE BOUVIER - ROLE DE DIFFERENTS PARAMETRES.

La première technique utilisée a été celle préconisée par BOUVIER (18), qui consiste à étudier les variations de la densité optique à 350 mμ de 3 ml d'une dilution au 1/10 de plasma dans du sérum physiologique, auquel on ajoute 1,5 unités de thrombine. La courbe (temps en abscisse et densité optique en ordonnée) est une courbe en S qui comporte trois phases distinctes. **(Figure 4)**

— Une phase de latence, où il n'y a pas de variation de la densité optique en fonction du temps : elle dure environ trente secondes et correspond à la protéolyse (ou à la monomérisation).

— Puis, une phase de une minute trente à deux minutes environ, au cours de laquelle se produit une augmentation très importante de la densité optique : c'est la phase de polymérisation.

— Enfin, une phase de stabilisation de la densité optique, à pente très faible, correspondant à la troisième partie de la courbe.

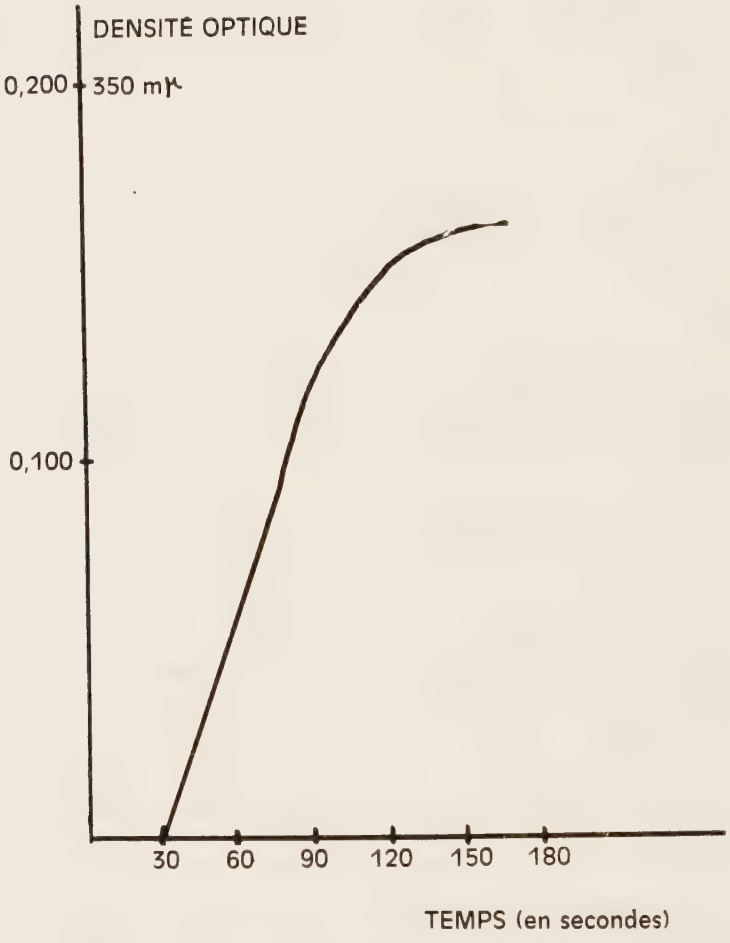


FIGURE 4 : COURBE DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE.

Nous avons étudié successivement le rôle de différents paramètres de la réaction de polymérisation.

1° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT.

— Il existe une relation linéaire entre la densité optique maximale et le taux de fibrinogène **(figure 5).**

— Les temps de monomérisation et de polymérisation restent inchangés quelle que soit la quantité de substrat, car la thrombine est en très grand excès par rapport à la quantité de fibrinogène.

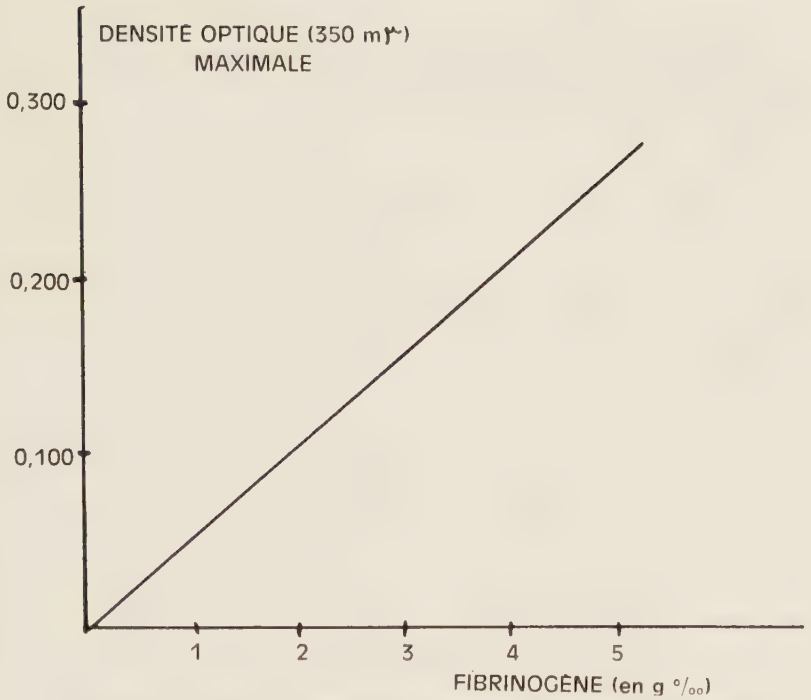


FIGURE 5 : RELATION ENTRE LA DENSITE OPTIQUE MAXIMALE ET LE TAUX DE FIBRINOGENE (EN PRESENCE DE THROMBINE).

2° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME.

Nous avons ajouté des quantités décroissantes de thrombine, c'est-à-dire 3 - 1,5 - 0,75 unités à 3 ml de plasma dilué au 1/10 dans du sérum physiologique. Plus la quantité de thrombine introduite est importante, plus le temps de monomérisation est court, et, par voie de conséquence, plus brève la phase de latence. Mais, la densité optique maximale reste inchangée.

3° INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE DU MILIEU (43 - 98 - 159).

Nous avons étudié le rôle de la force ionique du milieu. En effet, dans le test standard, la force ionique est de 0,15 M en chlorure de sodium : le temps de latence ou temps de monomérisation dure environ trente secondes à quarante-cinq secondes. Mais, si l'on abaisse au fur et à mesure la force

ionique, on constate une diminution du temps de latence, qui s'établit aux environs de quinze secondes et une augmentation de la densité optique maximale, ceci jusqu'à une force ionique de 0,05 M **(tableau II).**

Force ionique	0,15 M	0,12 M	0,08 M	0,05 M	0,017 M	0
Temps de latence (en secondes)	40	35	20	20	10	15
Temps de polymérisation (en minutes)	2	2	2	3	3	3
D.O. maximale	0,185	0,280	0,325	0,380	0,380	0,380

TABLEAU II : RELATION ENTRE LA FORCE IONIQUE D'UNE PART, LE TEMPS DE LATENCE ET LA D.O. MAXIMALE D'AUTRE PART.

4° INFLUENCE DU CALCIUM (151).

Nous avons étudié ensuite le rôle du calcium, qui est important. La phase de monomérisation est raccourcie à un temps inférieur à quinze secondes par l'addition de calcium, tandis que la densité optique maximale augmente de façon très importante. Le mécanisme de ce phénomène est inexpliqué.

5° INFLUENCE DU pH (98 - 131 - 159).

Il est facile de faire varier le pH de la solution de fibrinogène en utilisant différents tampons de Michaelis. A pH 5, l'addition de thrombine ne s'accompagne d'aucune variation de la densité optique, mais la neutralisation à pH 7 du milieu entraîne une augmentation de la densité optique maximale avec une phase de latence d'autant plus brève que le contact à pH 5 a été plus long.

Bien plus, cette phase de latence devient nulle si la neutralisation de la solution de fibrinogène est suffisamment tardive **(figure 6).**

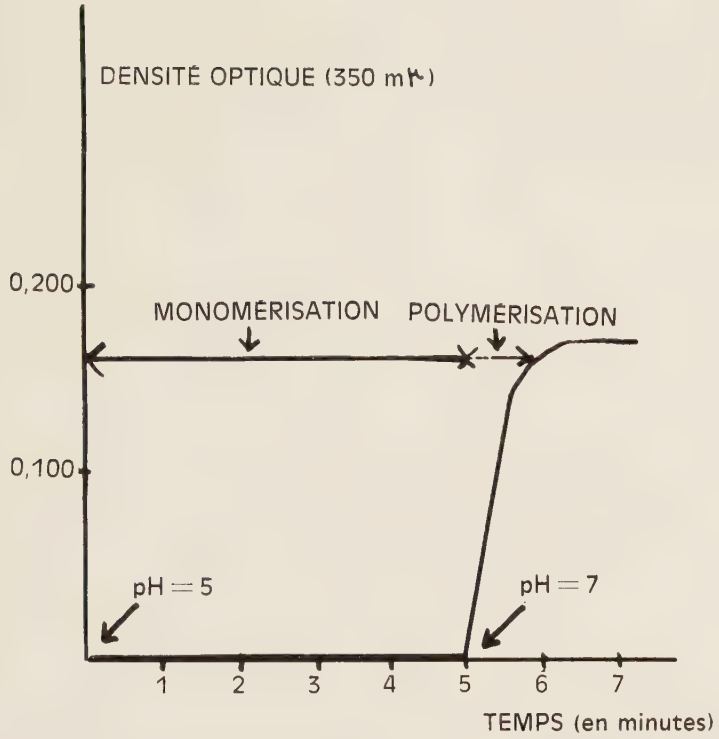


FIGURE 6 : INFLUENCE DU pH SUR LA POLYMERISATION.

Cette expérience montre bien que la monomérisation peut se produire à pH 5, tandis que l'agrégation n'a lieu qu'à pH neutre. La variation de pH de la solution de fibrinogène permet donc de séparer les deux phénomènes habituellement étroitement solidaires de la monomérisation et de la polymérisation. La méthode de préparation des monomères proposée par RATNOFF (148) utilise directement cet artifice.

6° INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT DU PLASMA.

La conservation du plasma à 0° C entraîne une diminution progressive de la densité optique maximale de la courbe de polymérisation tandis que le temps de thrombine et l'amplitude maximale du thromboélastogramme restent inchangés.

Par contre, la congélation du plasma à — 15° C permet une bonne conservation du plasma destiné à cette étude, comme le montrent les résultats du **tableau III.**

Temps de latence en secondes	Densités optiques					
	1er jour du prélèvement	5e jour après le prélèvement. Plasma conservé à :			10e jour après le prélèvement. Plasma conservé à :	
		37°	0°	— 15° congelé	0°	— 15°
45	0,010	0	0,010	0,010	0,003	0,010
60	0,090	0	0,070	0,090	0,010	0,090
90	0,170	0	0,120	0,170	0,040	0,160
120	0,190	0	0,150	0,200	0,045	0,190
150	0,200	0	0,155	0,200	0,046	0,195

TABLEAU III : INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT DU PLASMA SUR LA DENSITE OPTIQUE MAXIMALE DE LA COURBE DE POLYMERISATION.

7° INFLUENCE DU NOMBRE DES PLAQUETTES.

Nous avons analysé le comportement de plasmas riches en plaquettes (P.R.P.) et dépourvus de plaquettes (P.D.P.) et nous avons constaté qu'il y avait une relation stoechiométrique inverse entre le nombre de plaquettes et la densité optique maximale observée.

Les schémas ci-dessous illustrent ce phénomène **(tableaux IV et V).**

Temps	Densités optiques	
	P.R.P.	P.D.P.
30 sec.	0	0
45 sec.	0,060	0,100
60 sec.	0,200	0,220
70 sec.	0,250	0,300
90 sec.	0,275	0,330
120 sec.	0,300	0,365
180 sec.	0,305	0,370

TABLEAU IV : INFLUENCE DES PLAQUETTES SUR LA POLYMERISATION DE LA FIBRINE.

P.R.P.	P.D.P.	Nombre de plaquettes mm^3	D.O. maximale	Am. du TEG
0,4 ml	0	800 000	0,250	78
0,3 ml	0,1 ml	600 000	0,280	78
0,2 ml	0,2 ml	400 000	0,305	72
0,1 ml	0,3 ml	200 000	0,350	65
0	0,4 ml	0	0,370	40

TABLEAU V : NOMBRE DE PLAQUETTES ET DENSITE OPTIQUE MAXIMALE.

Conclusion.

L'amplitude maximale du thromboélastogramme est directement proportionnelle au nombre de plaquettes. La densité optique maximale de la courbe de polymérisation est inversement proportionnelle à la concentration du milieu en ces éléments figurés du sang.

Ces deux méthodes explorent donc deux propriétés physiques différentes du caillot, solidité mécanique dans le cas de la thromboélastographie, opacité du reticulum fibrineux liée à la texture des fibres dans la méthode photométrique.

D'ailleurs GREENE et MAC CONNAUGH (70) ont montré que :

— Les caillots formés à partir du plasma riche en plaquettes sont constitués par un réticulum à mailles serrées de fibres fines et courtes, alors que

— Des caillots aplaquettaires montrent des fibres longues et épaisses.

8° INFLUENCE DES EQUIVALENTS PLAQUETTAIRES.

La céphaline (*) ajoutée dans la proportion de 0,50 ml pour 3 ml de solution diluée de fibrinogène provoque une légère diminution de la densité optique maximale **(tableau VI).**

(*) Céphaline STAGO reconstituée avec de l'eau distillée non acide, selon le protocole fourni par le laboratoire.

Temps	Densités optiques	
	Plasma témoin + 0,50 ml d'eau distillée	Plasma témoin + 0,50 ml céphaline
30 sec.	0	0
45 sec.	0,025	0,035
60 sec.	0,180	0,190
75 sec.	0,240	0,220
90 sec.	0,280	0,240
105 sec.	0,290	0,260
120 sec.	0,295	0,260
135 sec.	0,295	0,260

TABLEAU VI : ACTION DE LA CEPHALINE SUR LA POLYMERISATION DE LA FIBRINE.

B) TECHNIQUE DE HOLLARD ET SUSCILLON. ROLE DE DIFFERENTS PARAMETRES.

Nous avons effectué une étude tout à fait comparable en utilisant une méthode proposée par HOLLARD et SUSCILLON (77).

Nos résultats confirment ceux précédemment trouvés.

La technique de ces auteurs consiste à mesurer les variations cinétiques de la densité optique à 300 mμ d'un mélange composé de :

- 1 ml de solution de fibrinogène à différentes concentrations ;
- 1 ml de Cl_2Ca 3 M/50 ;
- 20μl de thrombine à 10 U internationales/ml = 0,2 unité.

Les résultats obtenus sont résumés dans les trois tableaux suivants :

1° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT **(tableau VII).**

Concentration en fibrinogène en g par litre	Thrombine/fibrinogène (Nbre d'unité de de thrombine/mg de fibrinogène)	Temps de monomérisation en secondes	Temps de polymérisation en secondes
1	0,2	100	30
2	0,1	100	30
4	0,05	100	30
6	0,037	105	30
8	0,025	125	30
10	0,02	135	35
15	0,015	190	45
20	0,01	250	55

TABLEAU VII : TEMPS DE MONOMERISATION ET DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE EN FONCTION DU TAUX DE FIBRINOGENE INITIAL.

2° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME **(tableau VIII).**

Les temps de monomérisation et de polymérisation varient en sens inverse de la concentration en thrombine : $\frac{\text{thrombine}}{\text{fibrinogène}}$ augmente.

Ils tendent vers zéro quand le rapport ——— augmente.

Nbre d'unités de thrombine apporté par 20 µl	Nbre d'unité de thrombine /mg de fibrinogène	Temps de monomérisation en secondes	Temps de polymérisation en secondes
0,1	0,008	350	60
0,2	0,016	190	45
0,4	0,032	100	35
0,8	0,065	50	30
1,2	0,1	40	30
2,4	0,2	30	30

TABLEAU VIII : TEMPS DE MONOMERISATION ET DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN THROMBINE.

3° INFLUENCE DU CALCIUM **(tableau IX).**

En dessous d'une certaine dose, le calcium active la

transformation du fibrinogène en fibrine. Au-delà de cette dose, il joue, à l'inverse, un rôle inhibiteur.

Concentration en calcium	mg de Ca^{++}/mg de fibrinogène	Temps de monomérisation
0	0	110 sec.
M/80	0,04	100 sec.
M/40	0,08	80 sec.
M/30	0,12	80 sec.
M/20	0,16	100 sec.
3 M/50	0,20	140 sec.
M/10	0,32	200 sec.

TABLEAU IX : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM SUR LA TRANSFORMATION DU FIBRINOGENE EN MONOMERES DE FIBRINE.

C) TECHNIQUE DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE INDUITE PAR LA REPTILASE.

Nous avons mis au point au laboratoire une technique de polymérisation de la fibrine, utilisant la REPTILASE au lieu de la thrombine. On opère sur 3 ml de plasma dilué au 1/10 dans du sérum physiologique auquel on a ajouté 0,2 ml de REPTILASE et l'on étudie la variation de la densité optique à 350 $m\mu$. Les temps de latence et de polymérisation sont respectivement de une minute trente et trois minutes environ. On observe une relation linéaire entre la densité optique maximale et le taux de fibrinogène. Les résultats obtenus sont représentés sur la courbe ci-dessous **(figure 7).**

Cependant, il est à remarquer que la densité optique maximale est légèrement supérieure par cette technique à celle obtenue dans les mêmes conditions en présence de thrombine.

Rappelons qu'en présence de REPTILASE la polymérisation des fibres de fibrine ne se fait pas transversalement puis longitudinalement, mais bout à bout.

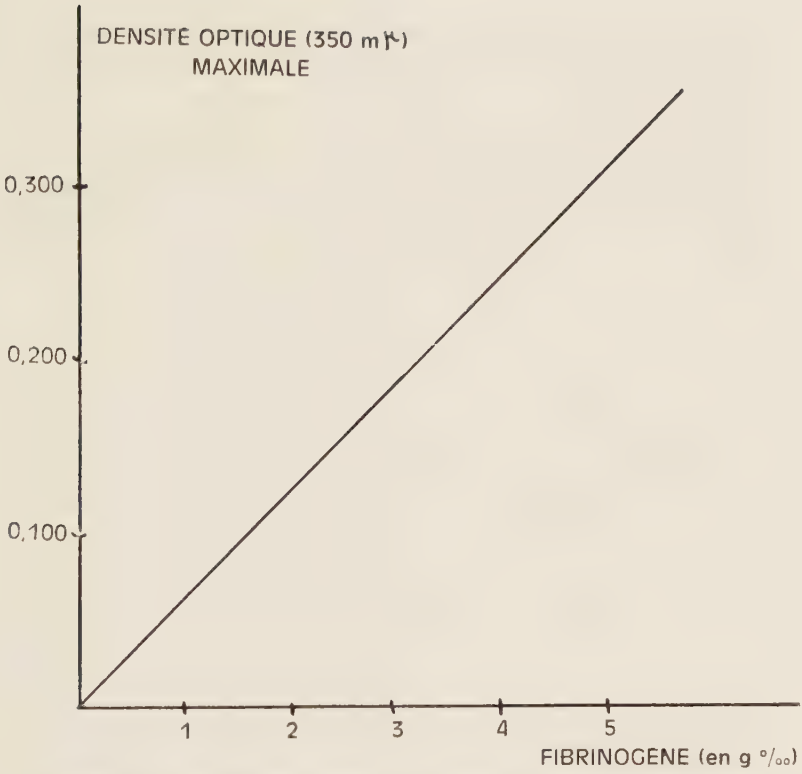


FIGURE 7 : RELATION ENTRE LA DENSITE OPTIQUE MAXIMALE, EN PRESENCE DE REPTILASE, ET LE TAUX DE FIBRINOGENE.

La solution de REPTILASE (*) utilisée est à une concentration telle que 0,1 ml de ce réactif coagule 0,3 ml de plasma normal en vingt-cinq secondes.

Dans des essais préliminaires, nous avons fait varier la quantité de REPTILASE.

Plus il y a d'enzyme, plus la densité optique finale est importante. Nous avons établi la courbe de polymérisation en présence de 0,5 ml, 0,4 ml, 0,20 ml et 0,15 ml de REPTILASE, et avons choisi finalement le taux de 0,20 ml de produit, pour lequel la densité optique finale est voisine de celle obtenue avec la thrombine.

Nous avons étudié comparativement les courbes de polymérisation de différents plasmas pathologiques en utilisant la REPTILASE d'une part et la thrombine d'autre part.

(*) REPTILASE « R » - Laboratoire STAGO.

Les résultats, en dehors de ceux des plasmas héparinés, ont toujours été tout à fait comparables.

C'est dans le cas particulier des plasmas de malades traités par l'association d'un agent thrombolytique et d'héparine que cette technique nous a rendu de précieux services.

Elle nous a effectivement permis de dissocier l'action de l'anticoagulant de celle des produits de dégradation.

RECHERCHE D'UNE ACTIVITÉ ANTITHROMBIQUE

Les allongements du temps de thrombine pouvant être aussi bien dus à une neutralisation de la thrombine qu'à un trouble de la polymérisation, bloquant la fibrinoformation au stade de monomères, nous avons étudié par des tests spécifiques chacune des phases de la fibrinoformation.

La recherche et le dosage de l'antithrombine vraie sont effectués en mesurant la diminution éventuelle d'activité de la thrombine après action des différents échantillons à étudier.

Le dosage de la thrombine est basé sur l'action estérasique de cette dernière sur différents substrats synthétiques (32 - 170) tels que l'ester éthylique de la benzoyl-arginine (55). Elle aboutit à la benzoyl-arginine et se traduit :

— soit par une augmentation de la densité optique pour une longueur d'onde donnée (le spectre d'absorption des deux substances étant différent),

— soit par une acidification du milieu par libération d'une fonction acide lors de l'hydrolyse.

Nous avons étudié simultanément ces deux modes d'appréciation d'activité.

A) TECHNIQUE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE SCHWERT ET TAKENAKA (158).

Elle consiste à étudier la variation de la densité optique à la longueur d'onde de 254 mμ induite par la dégradation de 0,05 ml de l'ester éthylique de la benzoyl-arginine (B.A.E.E.) 0,01M préalablement dilué dans 3,2 ml de tampon pH : 7,5 (tris 0,05 M, Cl Na 0,07 M), sous l'action de 0,1 ml de thrombine titrant 10, 25 ou 50 unités internationales/ml.

La courbe de la variation de densité optique en fonction du temps est linéaire. L'augmentation de densité optique en dix minutes est proportionnelle à la quantité de thrombine ajoutée **(figure 8** et **tableau X).**

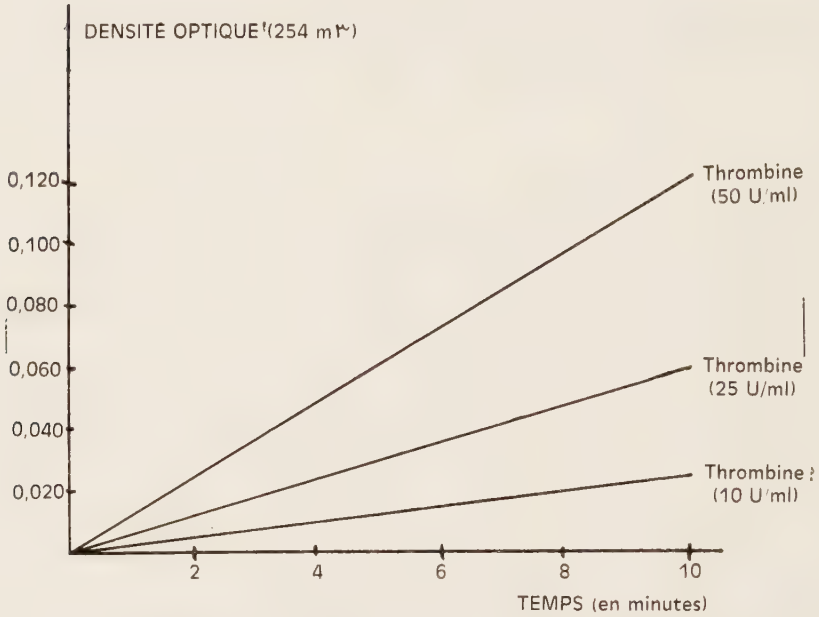


FIGURE 8 : VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE, EN FONCTION DU TEMPS, DUE A LA DEGRADATION DU B.A.E.E. PAR LA THROMBINE.

Résultats obtenus :

Variation de D.O. en		2 mn	4 mn	6 mn	8 mn	10 mn
3,2 ml de tampon +	10 u/ml	0,005	0,010	0,015	0,020	0,025
0,05 ml B.A.E.E. +	25 u/ml	0,012	0,025	0,036	0,048	0,060
0,10 ml de thrombine à	50 u/ml	0,025	0,050	0,070	0,095	0,120

Blanc : 3 ml de tampon + B.A.E.E. 0,05 ml

TABLEAU X : ACTION ESTERASIQUE DE LA THROMBINE SUR LE B.A.E.E.

B) TECHNIQUE AU pH STAT.

Dans la méthode précédente, le trouble inévitable induit par la solution des produits à étudier gêne la mesure de la variation de densité optique en fonction du temps et entraîne une diminution de la sensibilité du photomètre.

C'est pourquoi nous avons contrôlé les résultats précédents par une technique acidimétrique utilisant un pH stat.

Le PRINCIPE de cette méthode est assez simple :

L'addition de thrombine à une solution de l'ester éthylique de la benzoyl-arginine à pH : 7,4 (pH optimum) provoque une acidification du milieu. La quantité de soude N/1 000 à ajouter pour empêcher cette variation de pH au cours du temps renseigne sur la quantité de B.A.E.E. hydrolysée.

Rappelons que l'utilisation d'une molécule de soude correspond à l'hydrolyse d'une molécule de B.A.E.E.

L'APPAREILLAGE (*) :

Il comporte une cuve thermostatée, une microburette et un enregistrement automatiques.

LES RESULTATS :

La courbe obtenue indique les quantités de soude utilisées au cours du temps pour s'opposer à la variation du pH **(figure 9).**

Les résultats obtenus par cette méthode élégante ont été parallèles à ceux obtenus par la technique chimique spectrophotométrique de SCHWERT et TAKENAKA.

(*) Nous remercions M. VAIREL du Laboratoire CHOAY qui nous a initiée à la réalisation de cette technique et mis ses appareils à notre disposition.

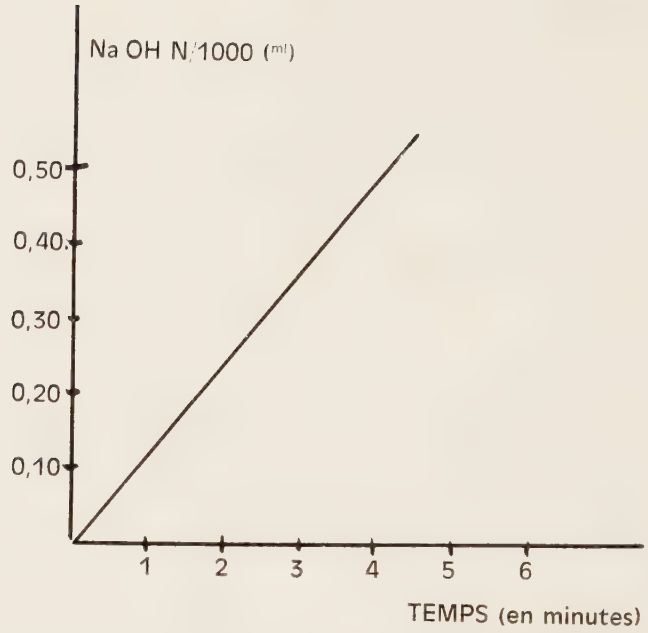


FIGURE 9 : COURBE CORRESPONDANT A L'HYDROLYSE DE 0,2 ml DE B.A.E.E., 0,02 M (pH : 7,4) PAR 0,1 ml DE THROMBINE A 5,4 UNITES INTERNATIONALES/ml.

En abscisses : temps 1 mn = 1 cm. En ordonnées : quantité de Na OH N/1 000 - 0,1 ml = 1 cm (en 3 mn, il a fallu introduire 0,36 ml de Na OH N/1 000 pour maintenir le pH constant).

RECHERCHE D'UNE ACTIVITÉ ANTIPOLYMERASE

Un allongement du temps de thrombine peut être dû à des substances qui se fixent sur les monomères de fibrine, en les empêchant ultérieurement de se polymériser. Aussi convient-il, pour vérifier cette éventualité, de préparer des monomères normaux de fibrine et d'étudier leur polymérisation en présence ou non de substances susceptibles de se combiner avec eux.

Le problème de la préparation des monomères normaux de fibrine est délicat.

Nous avons utilisé deux techniques différentes :

— L'une proposée par DONNELLY et modifiée par LATALLO.

— L'autre, mise au point par RATNOFF, consiste d'abord à bloquer le stade de la fibrinoformation au stade monomères en opérant à pH 5 (la polymérisation ne pouvant avoir lieu à pH acide).
Dans un deuxième stade, on étudie la polymérisation en présence d'inhibiteurs éventuels en ramenant le pH à 7 après avoir bloqué l'action de la thrombine par un inhibiteur spécifique : l'hirudine.

A) PREPARATION DES MONOMERES DE FIBRINE SELON DONNELLY ET LATALLO. APPLICATION A LA RECHERCHE D'UNE ANTIPOLYMERASE.

1° PREPARATION DES MONOMERES.

Elle est longue et délicate (*) (38 - 98). Elle consiste à

(*) Nous remercions Mme LARRIEU, Maître de Recherches à l'I.N.S.E.R.M., qui nous a initiée à la réalisation de cette technique.

coaguler une solution de fibrinogène humain Kabi dissous en tampon tris 0,05 M, Cl H 0,1 M (pH 7,9) par de la thrombine. Le caillot ainsi formé en l'absence de calcium, après avoir été lavé et essoré, est formé d'agrégats liés par des liaisons hydrogène (le FSF étant inactif) aisément rompues par des produits tels que le bromure de sodium.

Le caillot est donc dissous dans une solution de pH 5,5 composée de bromure de sodium 2 M et d'acétate de sodium 0,05 M (1 ml de solution pour 20 mg de fibrinogène de départ). Cette solution de monomères ainsi obtenue est purifiée par trois polymérisations successives suivies du retour au stade monomères, afin de priver complètement les monomères de toute trace de thrombine.

Les polymérisations successives sont obtenues par dilution de la solution de monomères dans un volume d'eau distillée et vingt-quatre volumes d'un tampon pH 6,4 préparé à partir de phosphate disodique 0,015 M et de phosphate mono-potassique 0,03 M.

A chaque stade, la polymérisation exige au moins une heure pour s'accomplir. Le dernier polymère obtenu est redissous dans 1 ml de bromure de sodium 2 M pour 100 mg de fibrinogène de départ, afin d'avoir une solution de monomères assez concentrée, les différentes opérations ayant provoqué à chaque étape une perte en protéine coagulable.

La concentration protéique est déterminée par absorption à 280 mμ après dilution convenable des monomères dans un tampon tris 0,15 M, urée 5 M, afin d'éviter une polymérisation qui modifierait profondément la densité optique, et de ce fait, fausserait le dosage des protéines. On opère comparativement à une gamme constituée par des solutions d'albumine bovine de concentration croissante.

La solution de monomères obtenue au laboratoire titrait 7 g de protéine/litre.

2° CONSERVATION DES MONOMERES.

Les monomères ainsi préparés sont conservés à 0° C, mais se détériorent rapidement.

3° POLYMERISATION DES MONOMERES.

La courbe de polymérisation de 0,1 ml de cette solution de monomères additionnée de 1,6 ml de tampon Imizadole 0,05 M, Cl Na 0,10 M, pH 6,2 est la suivante **(figure 10, tableau XI).**

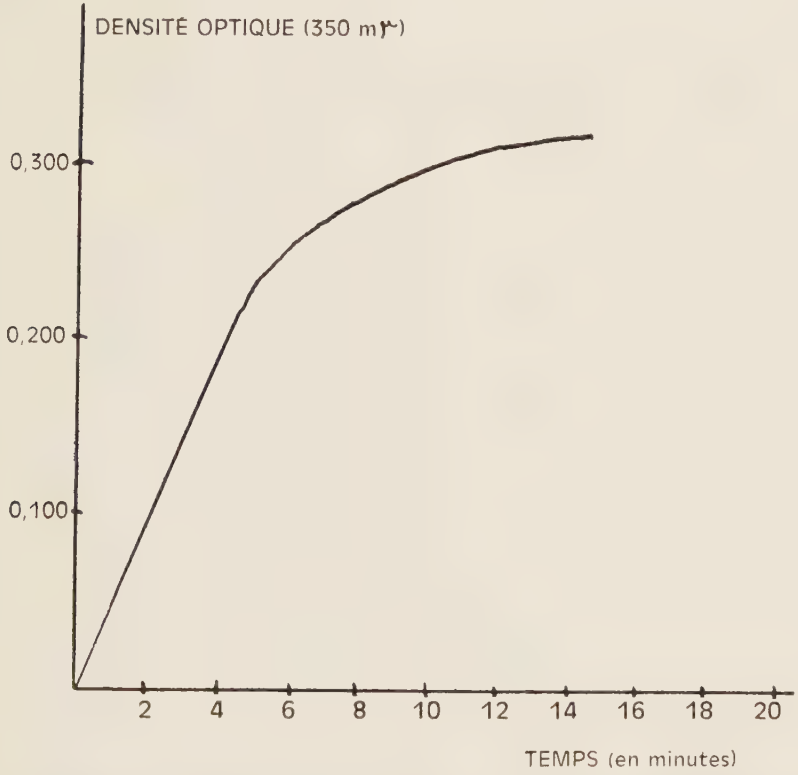


FIGURE 10 : COURBE DE POLYMERISATION DES MONOMERES DE FIBRINE (préparés selon la technique de DONNELLY et LATALLO).

Temps	Variation D.O. à 350mμ
0	0
2 mn	0,100
4 mn	0.190
6 mn	0,240
8 mn	0,260
10 mn	0,300
15 mn	0,315
20 mn	0,325
30 mn	0,330

TABLEAU XI : VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE, INDUITE PAR LA POLYMERISATION DES MONOMERES DE FIBRINE.

A partir des monomères ainsi préparés, il est facile d'analyser l'action inhibitrice d'une substance sur la polymérisation. Pour cela, il suffit de remplacer dans la réaction précédente un volume de tampon par un volume de la solution à étudier.

B) PREPARATION DES MONOMERES DE FIBRINE SELON RATNOFF. APPLICATION A LA RECHERCHE D'UNE ANTIPOLYMERASE.

1° PREPARATION DES MONOMERES.

Les monomères de fibrine sont préparés à partir de 0,5 ml de plasma amené à pH 5,2 par addition de 1 ml de tampon de Michaelis pH 2,6 et de 0,1 ml de thrombine à 10 unités ou 50 unités/ml en solution dans le tampon de Michaelis à pH 5,2 (148).

2° POLYMERISATION DES MONOMERES.

Elle consiste à étudier :

- soit la polymérisation à différents stades de la monomérisation,
- soit la courbe de polymérisation, une fois la monomérisation achevée.

Dans le premier cas, il faut, à intervalles de temps réguliers, prélever 0,2 ml de la dilution précédente de plasma en cours de monomérisation, et mesurer la vitesse de polymérisation. Celle-ci est induite par l'addition de 0,2 ml d'une solution convenable d'hirudine à pH 9,6 en tampon de Michaelis qui neutralise le pH de la solution (permettant la polymérisation) et qui inhibe complètement la thrombine, bloquant le premier stade de la fibrinoformation. Ainsi, seul le deuxième stade ou agrégation est étudié.

Un essai préliminaire montre que la solution à 0,75 unité/ml d'hirudine inactive la solution de thrombine à 10 unités/ml dans les conditions de l'expérience.

Une solution à 3,5 unités/ml d'hirudine doit être utilisée quand la solution de thrombine employée titre 50 unités/ml.

Le tableau suivant représente les durées respectives de la polymérisation des monomères prélevés à des temps variables au cours de la préparation **(tableau XII).**

L'addition du plasma à tester à la solution de monomères permet la recherche d'une antipolymérase, celle-ci, en effet, allonge le temps de polymérisation des monomères normaux.

Temps d'incubation lors de la formations des monomères	3 mn	4 mn	5 mn	6 mn	7 mn	8 mn	9 mn
Temps de polymérisation de — 0,2 ml de la solution de monomères — 0,1 ml sérum physiol. — 0,2 ml d'hirudine 0,75 u/ml	45 sec.	27 sec.	20 sec.	15 sec.	14 sec.	8,5 sec.	8,5 sec.

TABLEAU XII : VITESSE DE POLYMERISATION
DES MONOMERES DE FIBRINE
A DES TEMPS VARIABLES DE LEUR PREPARATION

Dans le deuxième cas (technique mise au point personnellement au laboratoire), il faut attendre que la monomérisation soit achevée, ce qui demande moins de dix minutes, surtout lorsque l'on utilise une solution de thrombine forte à 50 u/ml. Au bout de ce temps, on soumet à la photométrie 0,5 ml de solution de monomères de fibrine additionnée d'un volume égal de solution d'hirudine à pH 9,6 titrant 3,5 unités/ml, et de 0,85 ml de sérum physiologique, ou du produit à tester plus ou moins dilué.

Ce mélange doit être effectué très rapidement car la polymérisation est presque instantanée, comme le montrent le **tableau XIII** et la **figure 11.**

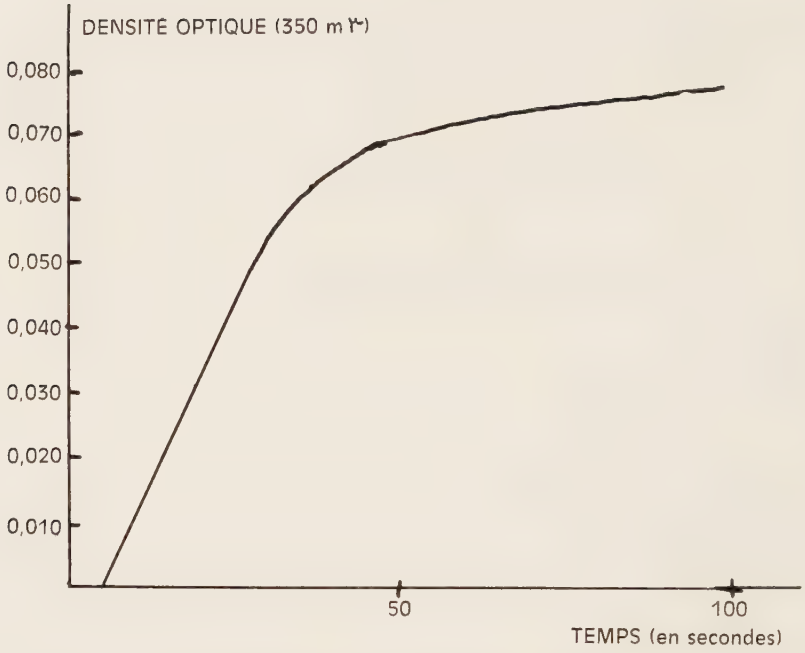


FIGURE 11 : COURBE DE POLYMERISATION DES MONOMERES DE FIBRINE (préparés selon la technique de RATNOFF).

Temps	Variation densité optique à 350 mμ
5 sec.	0
10 sec.	0,015
30 sec.	0,055
60 sec.	0,070
90 sec.	0,075
120 sec.	0,077
150 sec.	0,078

TABLEAU XIII : VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE, INDUITE PAR LA POLYMERISATION DES MONOMERES DE FIBRINE (préparés selon la technique de RATNOFF).

DOSAGE DU FACTEUR DE STABILISATION DE LA FIBRINE

La dernière phase de la fibrinoformation consiste en la transformation du polymère soluble en fibrine insoluble sous l'influence d'un facteur plasmatique, le facteur XIII ou facteur stabilisateur de la fibrine. Ce facteur existe dans le plasma sous une forme inactive et ce n'est qu'après son activation par le calcium et la thrombine qu'il peut transformer le polymère soluble dans les solutions d'urée ou d'acide monochloracétique en polymère insoluble.

A) DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN IONS CALCIUM CONDUISANT A L'ACTIVATION IDEALE DU FSF.

Pour cela, à une quantité déterminée de fibrinogène, nous avons ajouté des doses croissantes de chlorure de calcium et une quantité fixe de thrombine : le caillot ainsi constitué est maintenu trente minutes à la température de 37° C, puis immergé dans une solution d'acide monochloracétique à 1 % durant une demi-heure. Le pourcentage de fibrine soluble est ensuite déterminé dans le surnageant par lecture photométrique à 280 mμ. Chacun de ces dosages a été exécuté parallèlement à un témoin d'expérience, comme le résume le **tableau XIV :**

	Dosage		Témoin 100 % de solubilité	
	Dosage	Blanc	Dosage	Blanc
Fibrinogène Armour 12 mg/ml	0,2 ml	—	0,2 ml	—
Chlorure de calcium à différentes dilutions	0,1 ml	0,1 ml	—	—
Thrombine Léo (dépourvue de chlorure de calcium) 5 unités/ml	0,1 ml	0,1 ml	—	—
Sérum physiologique	—	0,2 ml	0,2 ml	0,3 ml
Puis immersion 1/2 h à la température ambiante du caillot dans l'acide monochloracétique à 1 %	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml

TABLEAU XIV : SCHEMA D'ETUDE DE L'ACTIVATION DU FSF PAR LE CALCIUM.

Les résultats obtenus sont schématisés dans le **tableau XV.**

Molarité de chlorure de calcium	Pourcentage de solubilité
0	100
M/160	100
M/120	50
M/80	0
M/40	0
M/20	0
M/10	0
M/5	0
M/2,5	60
M	100

TABLEAU XV : CONCENTRATION CALCIQUE ET ACTIVATION DU FSF.

Les résultats montrent que l'optimum calcique est extrêmement large, ce qui permet pour les dosages ultérieurs de se placer dans les meilleures conditions.

B) ETUDE COMPARATIVE DES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DU FSF.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode quantitative satisfaisante pour l'étude de ce facteur. La mesure de solubilité du caillot plasmatique dans les solutions d'urée 5 M ou d'acide monochloracétique à 1 % ne permet que le dépistage des formes graves de déficit congénital, c'est-à-dire des taux de FSF inférieurs ou égaux à 1/100.

Les méthodes d'étude utilisées ont été les suivantes :

- Une méthode biologique utilisant un fibrinogène dépourvu de FSF.
- Des méthodes basées sur la présence de groupements SH libres dans le FSF,
  - — dont l'épreuve de tolérance à l'acide mono-iodacétique,
  - — et le dosage potentiométrique de ces groupements.

1° METHODE BIOLOGIQUE.

Si le principe est simple, la préparation du fibrinogène dépourvu de FSF est, par contre, d'exécution délicate.

a) PRINCIPE.

A une quantité constante de fibrinogène dépourvu de FSF, on introduit, sous forme de dilutions progressives de plasma, des concentrations décroissantes de FSF. Après coagulation par la thrombine en présence de calcium, on détermine la plus faible dilution qui n'empêche pas la solubilité totale du caillot dans l'un des solvants habituels. Le test se fait comparativement à un témoin.

b) PREPARATION DU FIBRINOGENE DEPOURVU DE FSF.

- La méthode de référence est celle proposée par FINLAYSON et MOSESSON (51). Elle utilise la chromatographie sur Diéthylamino-éthyl cellulose (D.E.A.E. cellulose). Elle est de réalisation difficile, mais donne d'excellents résultats : 50 g de D.E.A.E. cellulose sont préalablement lavés par de la soude et de l'eau puis déshydratés par de l'alcool à 95° ; ils sont ensuite placés dans une colonne de 4 x 40 cm, on y incor-

pore 2 g de fibrinogène préalablement purifié par précipitation au moyen de tampon phosphate 2 M, pH 6,6 - redissolution dans du tampon phosphate M/4, et finalement dialyse contre du tampon 0,005 M pH 8,6. On élue par ce même tampon, de façon à obtenir un débit de 300 ml/heure que l'on recueille par fraction de 10 ml.

Enfin, on mesure l'absorption de ces différentes fractions au photomètre à 280 mμ dans le but de surveiller l'apparition du pic de fibrinogène purifié. Pour toutes les fractions présentant une absorption, on précipite le fibrinogène selon la technique précédemment décrite.

Pour toutes les fractions présentant une absorption, on précipite le fibrinogène selon la technique précédemment décrite.

- Une seconde méthode a été proposée par JOSSO (communication personnelle). Elle est de réalisation plus simple, mais les résultats sont variables.

Une solution de fibrinogène humain à 4 g par litre dans du sérum physiologique est privée de FSF par trois passages successifs sur filtre d'amiante à 30 %, à la vitesse de 30 gouttes par minute.

L'élimination de traces résiduelles de FSF est obtenue par chauffage à 40° C pendant trois heures.

La solution ne peut être utilisée qu'après trois semaines au minimum de congélation à — 20° C. Un contrôle préalable doit, par ailleurs, toujours être pratiqué pour juger de la bonne qualité du réactif.

c) EXECUTION DE LA TECHNIQUE.

La technique originale consiste à déterminer la plus petite dilution de plasma qui n'empêche pas la dissolution totale du caillot, cela comparativement à un plasma témoin (voir **tableau XVI).**

Le caillot une fois obtenu est incubé durant trente minutes au bain-marie à 37° C, puis secondairement immergé dans 3 ml de solution d'acide monochloracétique à 1 % durant trente minutes à la température ambiante. Le caillot du tube

de contrôle qui, par définition, est dépourvu de facteur XIII, se redissout en moins de cinq minutes ; pour les autres tubes, on note après la demi-heure d'attente pour quelle dilution de plasma la dissolution est totale.

	Contrôle	Dosage
Fibrinogène sans FSF à 4 g °/₀₀	0,2 ml	0,2 ml
Tampon de Michaelis pH 7,6	0,1 ml	—
Plasma témoin ou malade dilué au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/20, 1/25, 1/32	—	0,1 ml
Thrombine 5 unités/ml en solutions dans du chlorure de calcium M/20	0,1 ml	0,1 ml
	30 mn à 37°	
Acide monochloracétique à 1 %	3 ml	3 ml
	30 mn à la temp. ambiante	

TABLEAU XVI : DOSAGE BIOLOGIQUE DU FSF.

d) RESULTATS :

Pour les plasmas normaux, les dilutions extrêmes obtenues pour lesquelles le caillot est encore soluble varient du 1/16 au 1/25 comme l'indique le **tableau XVII.**

Dilution de plasma	1/2	1/4	1/8	1/16	1/20	1/25	1/30
Caillot	+	+	+	+	—	—	—

TABLEAU XVII : DOSAGE BIOLOGIQUE DU FSF : PLASMA NORMAL.

Pour les plasmas pathologiques un déficit se traduit par la redissolution du caillot pour une dilution d'autant plus faible que le déficit est plus accusé.

f) VARIANTE PERSONNELLE.

Nous avons introduit à cette technique une variante personnelle, destiné à pallier le manque de précision quand les dilutions effectuées sont insuffisamment rapprochées.

Nous avons pensé qu'il était préférable de déterminer exactement la quantité de plasma nécessaire pour induire la solubilisation de 50 % du caillot de fibrine dépourvu de FSF.

Aux fortes dilutions la quantité de FSF apportée est insuffisante pour « vulcaniser » le caillot, qui restera entièrement soluble.

Aux faibles dilutions la quantité de FSF est en grand excès pour stabiliser et empêcher la redissolution du caillot. Mais entre ces deux extrêmes il existe une proportionnalité entre la quantité de FSF introduite et la quantité de fibrine non dissoute.

Notre technique personnelle est initialement identique à la précédente, mais après l'immersion du caillot pendant une demi-heure dans une solution d'acide monochloracétique à 1 %, le surnageant est homogénéisé et on lit l'absorption à 280 mμ comme l'indique le **tableau XVIII :**

	Dosage		Témoin 100 % de solubilité	
	Dosage	Blanc	Dosage	Blanc
Solution de fibrinogène dépourvu de FSF	0,2 ml	—	0,2 ml	—
Différentes dilutions de plasma témoin ou malade	0,1 ml	—	0,1 ml	—
Sérum physiologique	—	0,3 ml	0,1 ml	0,4 ml
Thrombine à 5 unités/ml dans chlorure de calcium M/20	0,1 ml	0,1 ml	—	—
	30 minutes à 37°		—	—
Puis immersion du caillot 1/2 heure dans 3 ml d'acide monochloracétique à 1 %	3 ml	3 ml	(pas de caillot) 3 ml	3 ml
lecture du surnageant à 280 mμ				

TABLEAU XVIII : DOSAGE BIOLOGIQUE DU FSF - TECHNIQUE PERSONNELLE.

Le témoin de solubilité doit être établi pour chaque dilution de plasma, afin d'éviter l'erreur due à l'absorption des

protéines plasmatiques autres que le fibrinogène.

La lecture de la densité optique de chaque tube est comparée à celle donnée par le tube correspondant à 100 % de solubilité.

Une simple règle de trois donnera le pourcentage de dissolution.

Les résultats obtenus sont transcrits sur une courbe : la quantité de plasma apportée est inscrite en abscisse, tandis que le pourcentage de solubilité est placé en ordonnée.

Un tableau établit la correspondance entre la dilution réalisée et le nombre de µl de plasma apporté **(tableau XIX).**

Dilution de plasma	1/20	1/16	1/14	1/12	1/10	1/8	1/6
Apportant respectivement	5 µl	6,2 µl	7,1 µl	8,3 µl	10 µl	12,5 µl	16,6 µl
					de plasma		

TABLEAU XIX : CORRESPONDANCE ENTRE LA DILUTION REALISEE ET LA QUANTITE DE PLASMA APPORTEE (en µl).

D'après la courbe obtenue, on détermine la quantité de plasma nécessaire à induire exactement 50 % de solubilisation du caillot de fibrine dépourvu de FSF.

Remarque. — Il faut signaler que, dans le cas éventuel d'une fibrinolyse associée, il est indispensable d'ajouter de l'inhibiteur de KUNITZ afin de neutraliser l'effet de la protéolyse susceptible d'égarer dans l'interprétation de la redissolution.

2° METHODES BASEES SUR LE DOSAGE DES GROUPEMENTS SH LIBRES DANS LE FSF.

a) ETUDE BASEE SUR L'INACTIVATION DU FSF PAR BLOCAGE DES GROUPEMENTS SH (133).

L'inactivation du FSF à l'aide de dérivés agissant spécifiquement par blocage au niveau des groupements SH tels que le mono-iodacétate de sodium (M.I.A.) ou l'acide para-

chloromercuribenzoïque (P.C.M.B.) est à la base de plusieurs méthodes de détermination du FSF. La quantité d'inhibiteur (M.I.A. par exemple) nécessaire à la neutralisation du FSF est d'autant plus élevée que la concentration de ce dernier est plus importante.

a) Technique proposée par Sigg et Duckert.

A du plasma de sédimentation spontanée (c'est-à-dire riche en plaquettes) on ajoute des doses croissantes de M.I.A., et on détermine après coagulation par le chlorure de calcium pour quelle concentration d'inhibiteur le caillot est soluble dans une solution d'urée 5 M (160).

La technique est explicitée dans le **tableau XX :**

Plasma riche en plaquettes	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
MIA s/volume de 0,1 ml	7 mg	5 mg	3 mg	1 mg
Cl_2Ca M/40	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
On laisse incuber 30 mn à 37° C puis le caillot est immergé dans l'urée 5 M	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

TABLEAU XX : DOSAGE DU FSF - TECHNIQUE DE SIGG ET DUCKERT.

La lecture de dissolution du caillot se fait au bout de 30 - 45 - 60 et 90 minutes. On exprime les résultats en chiffres de 0 à 4.

- 0 pour une dissolution totale,
- 4 en l'absence de dissolution,
- 1 - 2 et 3 pour les résulats intermédiaires.

L'étude a été faite chez 50 témoins. La moyenne des résultats obtenus est indiquée dans le **tableau XXI :**

MIA ajouté	Temps d'incubation			
	30 mn	45 mn	60 mn	90 mn
7 mg	2	1	0	0
5 mg	3	2	1	1
3 mg	4	3	3	2
1 mg	4	4	4	3

TABLEAU XXI: TECHNIQUE DE SIGG ET DUCKERT : RESULTATS NORMAUX.

La même expérience a été effectuée sur du plasma dilué au 1/2 dans une solution de fibrinogène dépourvu de FSF. La solution ainsi obtenue renferme donc 50 % de facteur XIII.

Les résultats sont exprimés dans le **tableau XXII :**

	30 mn	45 mn	60 mn	90 mn
MIA ajouté				
7 mg	1	0	0	0
5 mg	2	1	1	0
3 mg	3	2	2	1
1 mg	4	3	3	3

TABLEAU XXII : FSF ACTIVITE = 50 % PAR RAPPORT A LA NORMALE.

Des mesures comparables pratiquées sur des dilutions successives au 1/3 puis au 1/6 du plasma dans une solution de fibrinogène dépourvu de FSF conduisent aux résultats suivants **(tableaux XXIII et XXIV) :**

	30 mn	45 mn	60 mn	90 mn
MIA ajouté				
7 mg	1	0	0	0
5 mg	1	1	0	0
3 mg	2	2	1	0
1 mg	3	3	2	2

TABLEAU XXIII : FSF ACTIVITE = 33 % PAR RAPPORT A LA NORMALE.

	30 mn	45 mn	60 mn	90 mn
MIA ajouté				
7 mg	1	0	0	0
5 mg	1	0	0	0
3 mg	1	1	1	0
1 mg	2	2	2	1

TABLEAU XXIV : FSF ACTIVITE = 16 % PAR RAPPORT A LA NORMALE.

Etude critique de cette technique :

La lecture est très malaisée et il est difficile d'apprécier de façon précise la dissolution du caillot.

Au cours de ce travail, nous avons remarqué qu'il existait une relation bilogarithmique entre le pourcentage du facteur (par rapport à la normale) et la somme des chiffres traduisant la redissolution du caillot pour toute la gamme des concentrations en M.I.A.

Mais il faut reconnaître que les résultats sont dans la pratique très difficiles à interpréter car il existe une grande variation d'un technicien à l'autre. Ainsi :

- 100 % du facteur : 41 à 34,
- 50 % du facteur : 24 à 29,
- 33 % du facteur : 16 à 21,
- 16 % du facteur : 12 à 15.

Nous voyons donc que cette méthode est inapplicable à l'étude de faibles variations du taux de facteur XIII.

β) *Essai de modification de la technique de Sigg et Duckert.*

Les déficits congénitaux de FSF s'accompagnent toujours d'une réduction modérée, mais nette, de l'amplitude maximale, du thromboélastogramme, nous avons effectué une série de tracés après addition au plasma de concentrations croissantes de M.I.A.

Le protocole est résumé dans le **tableau XXV :**

	Contrôle	Fortes doses d'Inhibiteur	Faibles doses d'Inhibiteur
Plasma normal riche en plaquettes	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml
Sérum physiologique	0,05 ml	—	—
Solution de MIA à 1 mg/ml	—	0,05 ml	—
Solution de MIA à 0,25 mg/ml	—	—	0,05 ml
Chlorure de calcium M/8	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml

TABLEAU XXV : DOSAGE DU FSF PAR THROMBOELASTOGRAPHIE.

Interprétation des résultats :

Nous avons étudié parallèlement des sujets témoins et des sujets cirrhotiques :

— Pour les sujets normaux, le tracé montre une diminution surtout nette pour l'introduction de fortes doses de M.I.A.

— Pour les sujets cirrhotiques, la réduction de l'amplitude maximale est très prononcée, même avec l'apport de faibles doses d'inhibiteur ; cependant, il faut noter que cette altération trop importante ne peut pas être expliquée par la simple inactivation du FSF.

En conclusion, ces résultats montrent que le M.I.A. n'est pas un inhibiteur spécifique du FSF. Il bloque également le fonctionnement plaquettaire et peut-être aussi d'autres facteurs plasmatiques encore inconnus de la fibrinoformation.

Pour cette raison, cette dernière méthode ne peut être retenue pour l'exploration du facteur XIII.

b) ETUDE DU DOSAGE DES GROUPEMENTS - SH LIBRES PAR UNE METHODE AMPEROMETRIQUE (*) (28).

a) Principe.

Le FSF, à l'encontre du fibrinogène, possède un grand nombre de groupements SH libres (LAKI - LORAND - LOEWY).

La méthode de dosage est basée sur la réaction stoechiométrique suivante utilisant les sels d'argent :

$$R\,SH + Ag^+ + NO_3^- \longrightarrow RSAg + H^+ + NO_3^-$$

Le degré de dissociation des mercaptides étant très faible, un dosage de grande précision est possible.

L'apparition d'un excès d'ions Ag^+, lorsqu'il n'y a plus d'ions -SH libres, provoque l'apparition d'un courant de diffusion proportionnel à la quantité d'ions Ag^+ en excès (**figure 12**).

(*) Nous remercions M. le Professeur HOLLARD et M. SUSCILLON (C.E.N. Grenoble) de nous avoir accueillie dans leur laboratoire, de nous avoir initiée à la réalisation de cette technique et d'avoir mis à notre disposition leur matériel.

$I_D = I - Io = K\ (c\ Ag^+)$.

I_D = intensité de diffusion.

I = intensité lue sur le galvanomètre.

Io = intensité du courant existant avant l'apparition de l'excès d'ions Ag^+.

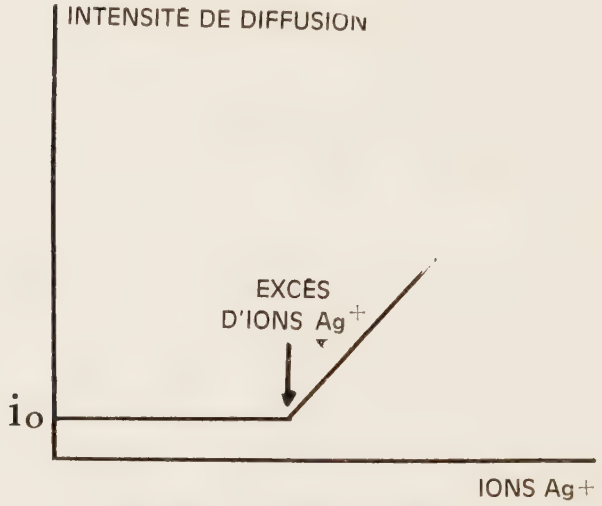


FIGURE 12 : DETECTION DES IONS Ag + PAR AMPEROMETRIE.

Les conditions doivent être telles que le courant de diffusion ne soit créé que par les ions métalliques libres.

La méthode utilisant les sels d'argent est celle qui convient le mieux car elle peut être utilisée en solution aqueuse, même en présence d'agents dénaturants.

Pour étudier le courant de diffusion, il est essentiel que les nitrates soient réduits, ce qui nécessite une électrode au calomel.

Enfin, on opère en présence de tris-hydroxyméthylaminométhane (sous forme de tampon tris) afin d'éviter la combinaison des ions Ag^+ avec les ions Cl^-. En effet, en présence de tris, les ions Ag^+ donnent naissance à un complexe aminé ; les ions Cl^- sont incapables de déplacer les ions Ag^+ de ce complexe, tandis que l'affinité des ions - SH pour ce métal permet de le libérer à partir du complexe aminé.

Pour cette expérience, les conditions électriques les meilleures sont :

— un potentiel de 0,1 volt à la cathode,

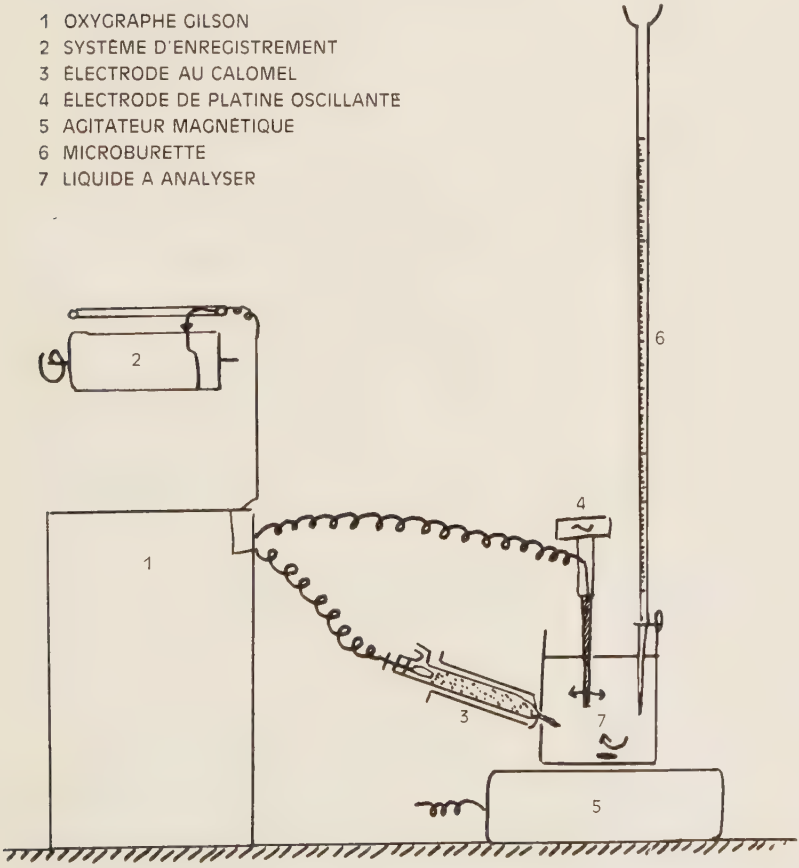
— une oscillation axiale de l'électrode de platine (120 cycles/seconde),

— une forte agitation de la solution à étudier.

β) *Appareillage* (figure 13).

Oxygraphe GILSON (G.M.E. modèle K) permettant :

— d'appliquer une tension faible et constante de 0,1 volt aux bornes des deux électrodes,



DISPOSITIF OXYGRAPHIQUE

FIGURE 13 : DISPOSITIF OXYGRAPHIQUE.

— de brancher une électrode de platine oscillante et une électrode au calomel,

— de recevoir sur un galvanomètre le courant de diffusion qui se produit dans le milieu étudié,

— enfin, de coupler le galvanomètre avec un enregistreur, donnant directement la courbe de variation de l'intensité du courant.

γ) *Technique utilisée.*

— **Réactifs :**

- Solution tampon tris 80 ml de tris M
  68 ml de NO_3H N
  6 ml de ClK M
  6 ml d'eau distillée

Ajuster à pH 7,4

- Solution de NO_3Ag 10^{-3} M
- Solution de cystéine 10^{-3} M

— **Remarques et précautions préliminaires :**

L'électrode au calomel doit être remplie de ClK saturé et frais. L'électrode de platine est trempée dix minutes dans NO_3H 5M puis lavée à l'eau distillée afin qu'elle ne soit pas polarisée.

— **Vérifications de la méthode et de l'appareillage :**

— Etablissement d'un témoin.

La solution à doser est constituée par :

- 10 ml d'eau distillée,
- 5 ml de tampons tris,
- 5 ml de solution d'urée 8 M.

Titrage par NO_3 Ag 0,5 x 10^{-3} M.
L'apparition de la vague d'intensité de diffusion a été observée pour 10 µl de NO_3 Ag 0,5 x 10^{-3} M.

— Etalonnage de la méthode avec des solutions de cystéine :

- 10 ml d'eau distillée,

- 5 ml de tris,
- 5 ml de solution d'urée 8 M
- 0,5 ml de cystéine 10^{-3} M.

La vague a été observée pour 950 µl de solution de NO_3 Ag 0,5 x 10^{-3} M.

Pour 0,2 ml de cystéine 10^{-3} M, la vague a été observée pour 400 µl de solution de NO_3 Ag 0,5 x 10^{-3} M.

— **Dosage des groupements - SH du fibrinogène Armour.**

Lorsque le dosage est pratiqué sur 5 ml de fibrinogène Armour en solution à 20 mg/ml, le courant de diffusion apparaît pour 250 µl de solution de NO_3Ag 0,5 x 10^{-3} M (ou 130 µl de NO_3Ag 10^{-3} M) **(figure 14).**

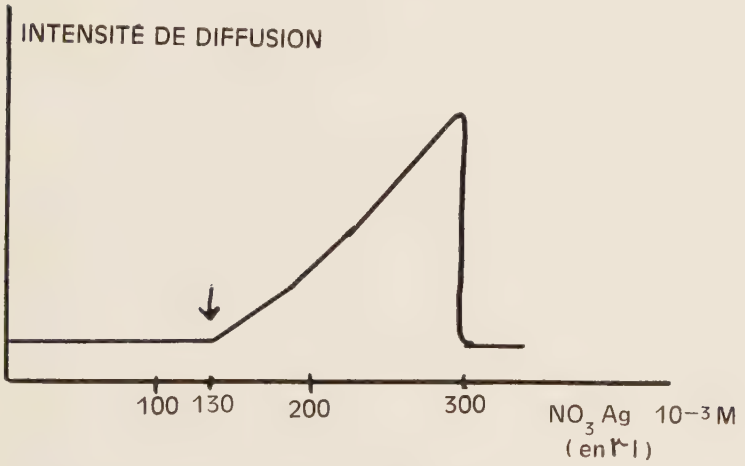


FIGURE 14 : DOSAGE DU FSF PAR METHODE AMPEROMETRIQUE TYPE DE COURBE OBTENUE.

— **Détermination des groupements - SH du FSF de plasmas témoins :**

Le problème qui se pose ici est le suivant :

- Isoler le complexe (fibrinogène - FSF) afin de ne doser que les groupements thiols du FSF et non ceux des autres protéines plasmatiques.

- De concentrer ce complexe (fibrinogène - FSF) à partir du plasma, car on ne peut pas utiliser des solutions plus diluées de nitrate d'argent.

  En effet, si la solution titrante était trop diluée on aurait une augmentation du milieu réactionnel, les ions Ag^+ en excès seraient en quantité trop faible et il en résulterait une certaine imprécision sur le point de départ de cette vague.

  De plus, si l'on utilise la solution de NO_3 Ag habituelle, le volume nécessaire pour saturer les groupements thiols est si petit que la sensibilité est là encore réduite.

  Aussi avons-nous été progressivement conduite à adopter la technique suivante :

  — 15 ml de plasma citraté,

  — 0,5 ml E.D.T.A. 2 % (pour bloquer tout le calcium),

  — 1 ml de thrombase à 50 unités/ml.

  Coagulation : attendre dix minutes à 37° C,

  — lavage soigneux du caillot dans l'eau distillée,

  — redissolution du caillot dans 5 ml d'urée 8 M (le caillot ainsi formé en l'absence de calcium est soluble).

  Titrage :

  5 ml de solution fibrinogène/urée 8 M,

  + 10 ml d'eau distillée,

  + 5 ml de tampon tris

  sont placés dans le becher de titration.

  Adjonction de NO_3 Ag $0{,}5 \times 10^{-3}$ M.

  La vague de courant de diffusion a été obtenue pour un volume de NO_3 Ag compris entre 180 et 210 µl selon les plasmas utilisés.

C) **RESULTATS.**

INTERET ET CRITIQUE DE CHAQUE TECHNIQUE.

— La technique biologique de référence est rigoureuse. Cependant l'obtention de fibrinogène dépourvu de FSF par chromatographie sur Diéthylamino éthyl cellulose est de préparation délicate.

— Le test de tolérance à l'acide mono-iodacétique ne semble pas à recommander car les résultats sont difficilement interprétables.

— La méthode ampérométrique de HOLLARD et SUSCILLON est satisfaisante, mais elle nécessite d'importantes quantités de plasma ; de plus l'appareillage est trop coûteux pour une utilisation qui est en fait plutôt restreinte.

Cependant, les résultats effectués simultanément par les trois techniques donnent des résultats sensiblement analogues.

ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE DU FIBRINOGENE ET DE SES PRODUITS DE DEGRADATION

Les caractères immunologiques sont déterminés par immunoélectrophorèse du plasma (migration sur gel d'agar-agar pendant deux heures à 250 volts, puis précipitation par du sérum de lapin antifibrinogène durant vingt-quatre heures (166) et enfin lavages successifs par du sérum physiologique et de l'eau distillée suivis de coloration des arcs de précipitation par l'amido-Schwartz) **(figure 14** bis**).**

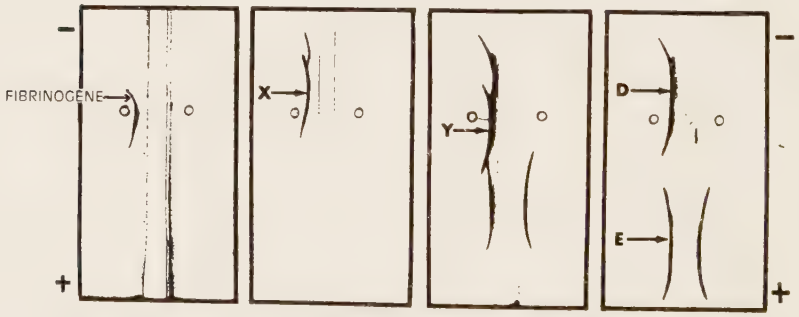


FIGURE 14 bis : IMMUNO-ELECTROPHORESE DU FIBRINOGENE ET DE SES PRODUITS DE DEGRADATION.

L'arc de précipitation du fibrinogène est relativement court. Il est situé de part et d'autre du godet de départ.

Les fragments obtenus par dégradation du fibrinogène par les substances fibrinolytiques donnent des arcs de précipitation différents selon le stade de dégradation (47 - 58 - 138 - 153).

Aux fragments de grande taille correspondent :

— L'arc X assez étalé de migration cathodique.

— L'arc Y assez étalé situé de part et d'autre du godet de départ.

Aux fragments de petite taille, qui ont donc migré beaucoup plus dans la gélose correspondent :

— L'arc D très étalé de migration cathodique.

— L'arc E très étalé de migration anodique.

CHAPITRE III

TROUBLES DE LA FIBRINOFORMATION ETUDE ANALYTIQUE

— TRAITEMENT PAR L'HEPARINE.

— TRAITEMENT PAR LE DEXTRAN ET LE RHEOMACRODEX.

— DYSFIBRINOGENEMIE RENCONTREE AU COURS D'UN ICTERE GRAVE.

— DYSFIBRINOGENEMIE CONGENITALE ET FAMILIALE.

— LA THROMBOLYSE.

— LE MYELOME.

— TAUX DE FSF DANS DIVERS CAS PATHOLOGIQUES.

La mise au point des méthodes analytiques d'étude de la fibrinoformation trouve son application pratique en clinique, car elle permet de mieux comprendre le mécanisme intime de son altération.

Nous étudierons dans ce chapitre différents troubles de la fibrinoformation démontrant le bien-fondé de cette notion.

TRAITEMENT PAR L'HEPARINE

L'héparine, anticoagulant actif par voie intraveineuse, agit essentiellement sur la dernière phase de la coagulation.

Elle présente une activité antithrombique importante (75), mais elle n'agit que lorsqu'elle est combinée avec un cofacteur plasmatique : l'antithrombine II (67).

Elle provoque donc un allongement très marqué du temps de thrombine. Cependant l'évaluation de l'héparine circulante par ce dernier test est une méthode assez grossière. En effet, l'activité de l'héparine dans le plasma est sous la dépendance de plusieurs facteurs (145), dont les plus importants sont :

- Sa neutralisation par les plaquettes et les leucocytes.
- Le taux du cofacteur plasmatique.

On considère, en pratique, que 0,3 unité internationale d'héparine, par exemple, neutralise 4 unités N.I.H. de thrombine. En réalité, la neutralisation est variable d'un plasma à l'autre.

— Dans des limites assez larges de concentration en héparine (jusqu'à 30 µg/ml de plasma) l'addition de 0,1 ml d'une solution à 0,5 ‰ de bleu de toluidine aux 0,2 ml de plasma corrige le trouble. Par ailleurs, la REPTILASE n'est pas influencée par l'héparine.

— Les courbes photométriques obtenues par addition de thrombine à des plasmas héparinés montrent (technique exposée chapitre II)

- Pour les prélèvements fortement héparinés : une absence de coagulation et aucune variation de densité optique.
- Pour les prélèvements faiblement héparinés : une phase de latence très allongée et une phase de polymérisation légèrement perturbée.

Par contre, la courbe pratiquée par addition de REPTILASE au plasma ne sera pas modifiée par la présence d'héparine (technique exposée, chapitre II).

Le trouble de la fibrinoformation ne siège pas au niveau de l'agrégation des monomères de fibrine car on aurait observé un temps de REPTILASE allongé.

D'ailleurs l'expérience suivante confirme cette hypothèse : elle consiste à étudier l'action de l'héparine sur la polymérisation des monomères de fibrine, en présence ou en l'absence d'héparine, selon le protocole indiqué par le **tableau XXVI :**

	Densité optique en fonction du temps à 350 mμ								
	0	2 mn	4 mn	6 mn	8 mn	10 mn	15 mn	20 mn	30 mn
0,1 ml monomères * 0 unité d'héparine 1,6 ml de tampon imidazole (réaction témoin)	0	0,100	0,190	0,240	0,260	0,300	0,315	0,325	0,330
0,1 ml monomères 1 unité d'héparine (0,1 ml) 1,5 ml de tampon imidazole	0	0,100	0,190	0,240	0,260	0,310	0,315	0,325	0,335

TABLEAU XXVI : INFLUENCE DE L'HEPARINE SUR LA POLYMERISATION DES MONOMERES DE FIBRINE *

Donc l'aspect étiré de la courbe de polymérisation de la fibrine traduit une production ralentie des monomères. L'agrégation de ces monomères ne se faisant qu'au fur et

(*) Monomères préparés selon la technique de DONNELLY modifiée par LATALLO (technique chapitre II).

à mesure de la production de ces derniers, sera, de ce fait, étalée dans le temps, mais il n'existe pas pour autant de trouble de la polymérisation.

CONCLUSION.

L'héparine est un inhibiteur exclusif de la première étape de la fibrinoformation car elle agit en inhibant la production de monomères de fibrine.

C'est une antithrombine vraie (36), dépourvue d'action sur la polymérisation.

TRAITEMENT PAR LE DEXTRAN

ET LE RHEOMACRODEX

Le Rhéomacrodex et le Dextran raccourcissent le temps de thrombine et le temps de REPTILASE d'un plasma **(tableau XXVII).**

Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre le raccourcissement de la coagulation et la concentration utilisée du produit.

	Temps de thrombine (en sec.)	Temps de reptilase (en sec.)
Plasma témoin + sérum physiologique (parties égales)	20	30
Plasma témoin + solution de Rhéomacrodex à 10 % (parties égales)	11,5	22
Plasma témoin + Dextran à 6 % (parties égales)	11	21

TABLEAU XXVII : ACTION DU RHEOMACRODEX ET DU DEXTRAN.

Ils provoquent de plus une augmentation de l'opacité finale des caillots.

Les phénomènes se traduisent sur la courbe de polymérisation de la fibrine effectuée en présence de thrombine ou de REPTILASE par un raccorucissement du stade de latence et une augmentation de la densité optique finale.

On a noté (comme le montre la **figure 15)** qu'il existait une relation linéaire entre l'augmentation de l'opacité et le taux de Rhéomacrodex.

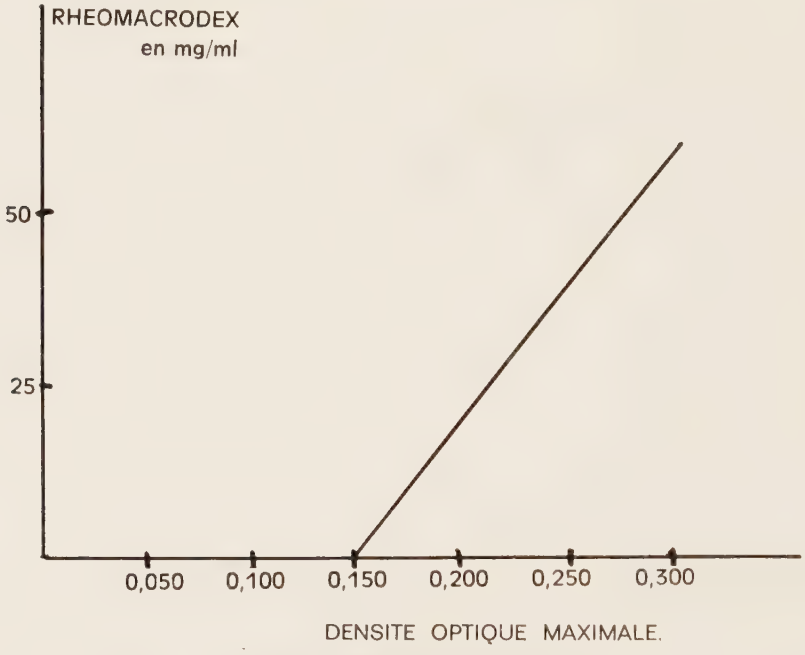


FIGURE 15 : RELATION LINEAIRE ENTRE L'AUGMENTATION D'OPACITE DU CAILLOT ET LE TAUX DE RHEOMACRODEX.

Les anomalies appelées « effet fibrinoplastique » ont été abondamment discutées dans la littérature (3), cependant aucune explication satisfaisante n'a été retenue à leur égard.

DYSFIBRINOGENEMIE RENCONTREE AU COURS D'UN ICTERE GRAVE

A l'occasion d'un ictère grave chez une femme de 50 ans, sans passé hémorragique, le bilan de la coagulation révèle, outre un effondrement des cofacteurs du complexe prothrombinique, un allongement très important du temps de thrombine et du temps de REPTILASE, non corrigé par le calcium **(tableau XXVIII).**

	Temps de thrombine (en sec.)	Temps de thrombine réactif en solution dans du chlorure de calcium M/40 (en sec.)	Temps de reptilase (en sec.)	Temps de reptilase réactif en solution dans du chlorure de calcium M/40 (en sec.)
Plasma témoin	21	21	18	23
Plasma malade	50	40	50	60
Plasma témoin + Plasma malade (parties égales)	25	—	—	—

TABLEAU XXVIII : DEPISTAGE D'UN TROUBLE DE LA FIBRINOFORMATION.

De plus, on notait une anomalie de la structuration du caillot (objectivée en tube et en thromboélastographie) :

1° En tubes, après la coagulation, le caillot était relativement « mou » et irrétractile malgré un nombre de plaquettes normal.

2° En thromboélastographie, le tracé était caractérisé par une diminution de l'amplitude maximale (11 mm au lieu de 20 mm) pour le plasma dépourvu de plaquettes.

— Le taux du facteur XIII était de 80 % par rapport à la normale.

A) **ANALYSE DE L'ALLONGEMENT DU TEMPS DE THROMBINE ET DU TEMPS DE REPTILASE.**

Cet allongement du temps de thrombine ne pouvait être expliqué :

— ni par un abaissement important du taux de fibrinogène (relativement fréquent dans les affections hépatiques gravissimes) ; en effet, quelle que soit la technique utilisée (gravimétrie, méthode de VON CLAUSS, précipitation à 56° C), il a été évalué à 1,70 g/litre ;

— ni par la présence d'antithrombines, car le temps de thrombine effectué sur le mélange à parties égales de plasma normal et de plasma pathologique était voisin de celui obtenu avec le plasma témoin pur.

B) **ETUDE DE LA POLYMERISATION DE LA FIBRINE AU SPECTROPHOTOMETRE.**

Elle a eu le mérite de mettre en évidence une anomalie très particulière de la fibrinoformation.

1° COURBE EFFECTUEE AVEC LE PLASMA DU MALADE (Technique de Bouvier).

Il y avait bien formation d'un caillot, mais celui-ci restait complètement translucide et le photomètre n'enregistrait aucune variation de la densité optique.

Cependant, l'addition de plasma témoin au plasma du malade corrigeait le trouble au prorata de la quantité de fibrinogène normal apportée.

2° COURBE EFFECTUEE AVEC LA SOLUTION D'EUGLOBULINES DU MALADE.

Curieusement la solution d'euglobulines préparée à partir du plasma de la malade, étudiée dans les mêmes conditions, a eu un comportement tout à fait différent.

Les temps de latence étant d'une minute, il existe donc un allongement important du temps de monomérisation, compte tenu de la force ionique très abaissée (normalement dans ces conditions le temps est voisin de 15 secondes).

Le seul examen macroscopique montrait que la coagulation de cette solution par la thrombine s'accompagnait d'une opacification manifeste qu'enregistrait bien la photométrie. Bien plus, la densité optique obtenue était en bon accord avec la concentration en fibrinogène de la solution d'euglobulines, comme l'a montré l'expérience suivante :

Mode opératoire :

Précipitation des euglobulines de 1 ml de plasma par de l'acide acétique très dilué et dissolution de ce précipité dans 4 ml de sérum physiologique ; à 3 ml de cette solution on a ajouté 1,5 unités de thrombine, et on a étudié les variations de densité optique en fonction du temps.

Les résultats obtenus sont objectivés dans le **tableau XXIX :**

Temps	30 sec.	45 sec.	1 mn	1 mn 30 sec.	1 mn 45 sec.	2 mn	3 mn	3 mn 30 sec.	4 mn
Variation densité optique 350 mμ	0	0,040	0,095	0,130	0,150	0,160	0,185	0,195	0,200

TABLEAU XXIX : COURBE DE POLYMERISATION EFFECTUEE SUR LA SOLUTION D'EUGLOBULINES.

La densité optique maximale égale à 0,200 correspond à 1,70 g/l. de fibrinogène, compte tenu de la dilution au 1/4 effectuée.

3° COURBES EFFECTUEES AVEC LE PLASMA DU MALADE, EN ABAISSANT LA FORCE IONIQUE DU MILIEU.

Pour des forces ioniques de 0,15 M à 0,12 M en chlorure de sodium, on n'observa aucune variation de densité optique. Pour une force ionique de 0,08 M en chlorure de sodium, l'opacification débuta. Elle augmenta ensuite progressivement pour atteindre un maximum pour une force ionique de 0,017 M en chlorure de sodium **(tableau XXX).**

Concentration en chlorure de sodium	0,15 M	0,12 M	0,08 M	0,05 M	0,017 M	0
Temps de latence	—	—	1 mn	1 mn	1 mn	1 mn
D.O. maximale	0	0	0,032	0,075	0,115	0,115

TABLEAU XXX : INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR LA POLYMERISATION DE LA FIBRINE.

Cette polymérisation au sein de la solution des euglobulines plasmatiques et dans les solvants de faible force ionique, nous a fait penser à une hydrolyse modérée, qui libérerait certains groupements permettant une polymérisation différente et nous a permis de suggérer l'existence éventuelle d'une anomalie de structure au niveau de la molécule de fibrinogène.

C) ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE DU FIBRINOGENE.

L'immuno-électrophorèse pratiquée avec le sérum de lapin antifibrinogène a révélé la présence d'un fibrinogène immunologiquement normal.

D) ETUDE CHIMIQUE DE LA MOLECULE DE FIBRINOGENE.

Il a été préparé du fibrinogène selon la méthode de LAKI à partir du plasma de ce malade et d'un plasma d'un sujet normal (*) : une étude comparée de leur fraction glucidique a été faite dans le laboratoire du professeur MESTER (130).

Le dosage des hexoses à l'anthrone a démontré que, dans cette dysfibrinogénémie, le taux des hexoses est réduit de moitié par rapport à celui du fibrinogène normal, avec un effondrement du taux de galactose.

(*) Nous remercions Mlle MENACHE du Centre National de Transfusion Sanguine d'avoir isolé le fibrinogène.

Par contre, le fibrinogène anormal contient un taux d'acide sialique très élevé, puisqu'il atteint presque le double de la normale.

Le **tableau XXXI** indique les résultats.

	Fibrinogène normal	Fibrinogène anormal
Hexoses	2,3 %	1,1 %
Rapport galactose/mannose évalué par chromatographie sur papier	83 %	10 %
Acide sialique	0,54 %	0,96 %

TABLEAU XXXI : DOSAGE DES GLUCIDES DANS LE FIBRINOGENE HUMAIN NORMAL ET DANS LE FIBRINOGENE HUMAIN ANORMAL.

La présence d'un taux élevé d'acide sialique dans le fibrinogène anormal pourrait bien rendre compte du retard à la coagulation sous l'action de la thrombine.

En effet, il a été mis en évidence que la diminution du taux d'acide sialique dans le fibrinogène provoque le phénomène contraire (c'est-à-dire l'accélération de la coagulation) sous l'action de la thrombine (30).

E) CONCLUSION.

Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature une anomalie de ce type.

L'origine de cette dysfibrinogénémie ne peut pas être affirmée car l'enquête familiale a été très incomplète. Seule une fille de la malade a pu être examinée : sa fibrinoformation est entièrement normale.

Le caractère transitoire ou permanent de l'anomalie n'a pu être déterminé en raison du décès de la malade. Le compte rendu anatomo-pathologique a confirmé le diagnostic d'hépatite ictérigène évolutive.

De toute façon, ce trouble de la fibrinoformation n'est accompagné d'aucun désordre hémorragique.

DYSFIBRINOGENEMIE CONGENITALE ET FAMILIALE

A propos d'un cas de dysfibrinogénémie congénitale et familiale rencontré au cours de notre travail, nous avons retrouvé dans la littérature quatre observations analogues.

En 1958, IMPERATO et DETTORI (79) décrivent pour la première fois chez une jeune fille qui présentait des troubles hémorragiques la présence d'un fibrinogène qualitativement défectueux.

Plus récemment, MENACHE à Paris (125), BECK à Baltimore (80) et VON FELTEN (177 bis) à Zurich ont présenté trois autres cas de dysfibrinogénémie congénitale. Les cas de MENACHE et de VON FELTEN, contrairement à celui de BECK, ne s'accompagnent d'aucune tendance hémorragique. Dans tous les cas décrits la tare est transmise selon le mode autosomal dominant.

Dans notre laboratoire (Service d'hématologie du Professeur BOUSSER, à l'Hôtel-Dieu) ce type d'anomalie a été découvert fortuitement à l'occasion d'un bilan pré-opératoire pratiqué avant une prostatectomie chez un homme de 60 ans.

Pour ce malade, les examens biologiques ont été les suivants :

A) BILAN CLASSIQUE DE L'HEMOSTASE - DEPISTAGE DE L'ANOMALIE.

1° TEMPS DE QUICK.

L'allongement important du temps de Quick, en contraste avec des taux de cofacteurs normaux, orienta le diagnostic

vers une hypofibrinémie majeure ou vers la présence d'une activité antithrombique anormale.

2° TAUX DE FIBRINOGENE.

Résultats discordants, selon les méthodes utilisées.

Il est de 2,70 g/litre par la méthode gravimétrique et les méthodes de précipitation par le sulfate d'ammonium ou par la chaleur. Cependant, par la méthode modifiée de VON CLAUSS, il est de 0,90 g/litre. C'est cette dernière mesure qui reflète le mieux l'anomalie de structuration du caillot, objectivée par ailleurs en tubes par une consistance défectueuse et au thromboélastogramme par une diminution de l'amplitude maximale (41 mm), ceci malgré un bilan plaquettaire normal.

3° TEMPS DE THROMBINE ET TEMPS DE REPTILASE.

Tous deux sont considérablement allongés. L'allongement du temps de reptilase élimine l'existence d'une antithrombine de type héparinique. **(Tableau XXXII).**

	Temps de thrombine	Temps de reptilase
Plasma témoin	21 secondes	18 secondes
Plasma malade	85 secondes	60 secondes

TABLEAU XXXII : ALLONGEMENT DU TEMPS DE THROMBINE ET DU TEMPS DE REPTILASE.

Avec une thrombine huit fois plus concentrée, coagulant le plasma témoin en 4 secondes, le plasma du malade coagule en 25 secondes.

Le tableau XXXIII montre les temps de coagulation obtenus pour le plasma témoin et le plasma pathologique, avec des quantités croissantes de thrombine.

Unités de thrombine/ml de réactif	2,5	3,12	6,25	12,50	25	50	100	200	400
Plasma témoin	21	15	10	7	4	4	4	4	4
Plasma pathologique	85	76	45	33	25	20	14	9	6

TABLEAU XXXIII : TEMPS DE COAGULATION AVEC DES QUANTITES CROISSANTES DE THROMBINE.

4° RECHERCHE D'UNE ANTITHROMBINE SERIQUE.

Elle s'est révélée négative puisque l'adjonction du sérum du malade à du plasma de sujet normal n'a pas entraîné un allongement du temps de thrombine de ce dernier.

- Plasma-témoin + sérum physiologique à parties égales = 21 secondes.
- Plasma-témoin + sérum du malade à parties égales = 17 secondes.

5° TAUX DU FACTEUR XIII.

Il est de 115 %, c'est-à-dire normal.

6° ETUDE DE L'ACTIVITE FIBRINOLYTIQUE.

Elle a été jugée par les tests de lyse des caillots de sang total, de plasma ou d'euglobulines et n'a décelé aucune anomalie.

B) LOCALISATION DE L'ANOMALIE.

Ces différents résultats nous ont alors fait évoquer l'hypothèse d'une dysfibrinogénémie, que nous avons pu vérifier ultérieurement par des examens complémentaires.

1° ABSENCE DE CORRECTION DU TEMPS DE THROMBINE ET DU TEMPS DE REPTILASE PAR APPORT DE PLASMA TEMOIN.

L'adjonction de plasma pathologique au plasma témoin entraîne un allongement du temps de thrombine et du temps de REPTILASE de ce dernier.

La confrontation de cette dernière épreuve avec celle pratiquée en présence de sérum, lors de la recherche d'une antithrombine sérique, permet d'envisager avec plus de certitude la présence de fibrinogène anormal. **(Tableau XXXIV).**

2° ABSENCE DE CORRECTION DU TEMPS DE THROMBINE PAR APPORT DE CHLORURE DE CALCIUM.

L'addition de chlorure de calcium ne provoque pas la correction du temps de thrombine du plasma pathologique signalée par MENACHE dans son observation. **(Tableau XXXIV).**

	Temps de thrombine	Temps de reptilase	Temps de thrombine (réactif en solution dans Cl_2 Ca M) / 40
Plasma témoin	21 secondes	18 secondes	26 secondes
Plama malade	85 secondes	60 secondes	80 secondes
Plasma témoin + aa Plasma malade	40 secondes	31 secondes	
Plasma témoin + aa Sérum malade	17 secondes		

TABLEAU XXXIV : DIAGNOSTIC D'UNE ANOMALIE QUALITATIVE DU FIBRINOGENE.

Le fibrinogène du malade perturbe donc la fibrinoformation d'un plasma normal.

3° COURBE DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE.

L'étude de la courbe de polymérisation pratiquée selon la méthode de BOUVIER dénote un allongement important du temps de latence et de la phase de polymérisation. Cependant, la densité optique finale obtenue est en bon accord avec le taux de fibrinogène évalué par pesée **(tableau XXXV** et **figure 16).**

	Temps de latence	Temps de polymérisation	Densité optique finale à 350 mμ
Plasma témoin ayant 2,70 g/l de fibrinogène	30 sec.	60 sec.	150
Plasma malade	150 sec.	360 sec.	155

TABLEAU XXXV : ANOMALIE DE LA FIBRINOFORMATION - TEST DE BOUVIER.

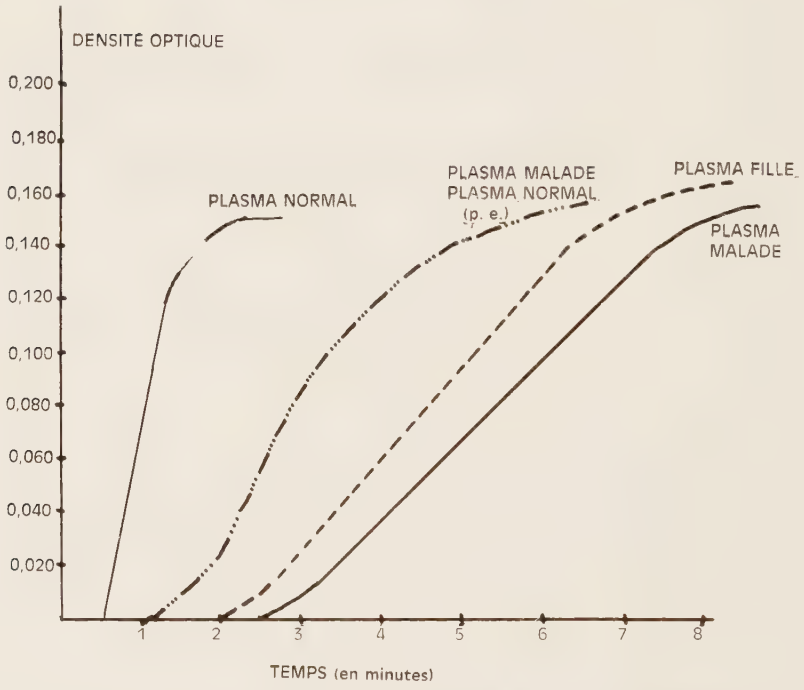


FIGURE 16 : ANOMALIES DES COURBES DE POLYMERISATION.

4° RECHERCHE D'ACTIVITE ANTIPOLYMERASE DU FIBRINOGENE ANORMAL.

L'adjonction de fibrinogène anormal, à des monomères normaux de fibrine préparés simultanément selon la technique de DONNELLY modifiée par LATALLO, puis selon la technique de RATNOFF, n'entrave pas la polymérisation de ces monomères normaux.

c.) TECHNIQUE DE DONNELLY MODIFIEE PAR LATALLO (exposée chapitre II). (TABLEAU XXXVI).

	Variation de densité optique au cours du temps								
	0 mn	2 mn	4 mn	6 mn	8 mn	10 mn	15 mn	20 mn	30 mn
0,1 ml monomères 1,6 ml tampon imidazole	0	0,100	0,190	0,240	0,260	0,300	0,315	0,325	0,330
0,1 ml monomères 0,1 ml plasma pathologique 1,5 ml tampon imidazole	0	0,100	0,200	0,250	0,315	0,330	0,340	0,345	0,350

TABLEAU XXXVI : POLYMERISATION DES MONOMERES NORMAUX DE FIBRINE, EN PRESENCE DE PLASMA DU MALADE.

b) TECHNIQUE DE RATNOFF (exposée chapitre II). (TABLEAU XXXVII).

Temps d'incubation lors de la formation des monomères	3 mn	4 mn	5 mn	6 mn	7 mn	8 mn	9 mn
0,2 ml monomères (pH 5) 0,1 ml plasma témoin 0,2 ml hirudine (pH 9,6)	45 sec.	45 sec.	30 sec.	23 sec.	16 sec.	12 sec.	12 sec.
0,2 ml monomères (pH 5) 0,1 ml plasma malade 0,2 ml hirudine (pH 9,6)	45 sec.	45 sec.	19 sec.	22 sec.	15 sec.	11 sec.	11 sec.

TABLEAU XXXVII : VITESSE DE POLYMERISATION DES MONOMERES NORMAUX DE FIBRINE A DES TEMPS VARIABLES DE LEUR FORMATION EN PRESENCE DE PLASMA NORMAL OU PATHOLOGIQUE.

5° ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DU FIBRINOGENE DU MALADE.

L'immunoélectrophorèse ne différencie pas le fibrinogène étudié d'un fibrinogène normal.

6° ASPECT DU CAILLOT AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE (71).

En dehors du fait que l'imprégnation des bandes sombres par l'acétate d'uranyle et le plomb est moins intense que pour la fibrine normale, cet examen ne révèle pas d'anomalie notable (*).

(*) Nous remercions M. le Docteur SEMAN (service du Professeur MATHE - Villejuif) d'avoir effectué ce travail.

C) MODE DE TRANSMISSION GENETIQUE DE L'ANOMALIE.

Il est dominant, non lié au sexe puisque l'anomalie est retrouvée chez trois enfants, deux filles et un garçon.

Une analyse chimique du fibrinogène est en cours pour tenter d'affirmer une anomalie de la molécule et d'en préciser son site.

D) ANOMALIE ET TENDANCE AU SAIGNEMENT.

Enfin cette dysfibrinogénémie familiale ne s'accompagne d'aucune tendance hémorragique spontanée. Bien plus, la prostatectomie s'est déroulée sans incident hémorragique.

E) CONFRONTATION DES DIFFERENTS CAS DE DYSFIBRINOGENEMIE CONGENITALE - CONCLUSION.

Un tableau établi ci-après permet d'établir une comparaison avec les quatre autres cas de dysfibrinogénémie publiés jusqu'à ce jour **(tableau XXXVIII).**

Il montre bien que notre observation présente de nombreux points communs avec le cas de MENACHE et celui de VON FELTEN, DUCKERT et FRICK.

Il s'en différencie toutefois par l'absence de correction du temps de thrombine après addition de calcium.

Selon DUCKERT, son cas serait tout à fait comparable à celui de MENACHE et les petites divergences rencontrées au cours de l'exploration biologique ne feraient que traduire une concentration différente du plasma en fibrinogène anormal. En effet, pour cet auteur, le plasma du malade renfermerait à la fois un fibrinogène normal et une proportion variable d'un fibrinogène anormal.

Il se produirait au cours de la coagulation des monomères de fibrine anormaux interférant lors de l'agrégation des monomères normaux.

	IMPERATO ET DETTORI	MENACHE	BECK - CHARACHE JACKSON	VON FELTEN DUCKERT - FRICK	CAS ETUDIE
Tendance au saignement	Modérée	Absente	Discrète	Absente	Absente
Temps de saignement	5 mn 30	5 mn	3 mn		4 mn
Nombre de plaquettes/mm3	310 000	593 000	250 000	320 000	280 000
Temps de coagulation (Lee et White)	Pas de caillot visible	Légèrement prolongé	Normal avec caillot friable	8 mn	Normal (8 mn) caillot friable
Temps de coagulation du plasma recalcifié	Allongé	Normal ou légèrement allongé	Normal	Normal	Normal
Rétraction caillot a) sang total b) plasma riche en plaquettes		++ (aspect particulier)	+++ grand culot de sédimentation de G.R. +++	Normale	+++ grand culot de sédimentation de G.R. +++
Temps de Quick	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal
Facteur II V VII + X XIII IX	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux
Consommation de Prothrombine	Normale	Normale	Normale	Normale	Normale
Amplitude maximale du thromboélastogramme	nulle	nulle	diminuée		diminuée
Solubité des caillots plasmatiques dans l'urée 5 M		Insoluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Mesure de la lyse du caillot a) Lyse des euglobulines b) Au thromboélastogramme	Normalement quand apport fibrinogène		Normale Normale	Normale Normale	Normale
Temps de thrombine Correction par le calcium		Infini partiellement corrigé	Allongé partiellement corrigé	Allongé	Allongé pas de correction
Effet du plasma du malade sur la coagulation d'un plasma normal par la thrombine		Inhibition	Pas d'inhibition		Inhibition
Temps de REPTILASE		Pas de coagulation	Pas de coagulation		Allongé
FIBRINOGENE : — Temps de thrombine — Gravimétrie — Précipitation à 56° C	diminué 0,75 g/l	diminué gel mais pas précipitation	diminue 0,30 g/l diminué 1,80 g/l 1g/l	0,30 g/l 4 g/l 4 g/l	diminué 0,9 g/l normal 2,7 g/l 2,70 g/l
Immuno-Electrophorèse		petite anomalie	petite anomalie	Normale	Normale
Sexe du patient	Féminin	Masculin	Féminin	Masculin	Féminin et Masculin
Membres de la famille atteints	Néant	Fils	3 filles	Père - Fils	2 filles - 1 fils
Membres de la famille sains	Frère- parents grands-parents maternels		2 fils et 3 générations de la famille maternelle	Frère	

TABLEAU XXXVIII : COMPARAISON DES DIFFERENTS CAS DE DYSFIBRINOGENEMIES.

THROMBOLYSE

C'est un traitement visant à obtenir, par la dissolution du thrombus, la revascularisation des membres chez les malades porteurs d'une obstruction artérielle aiguë. Il consiste à administrer au sujet de fortes doses de Streptokinase (S K) selon le protocole suivant :

Dans une première étape, la sensibilité du patient à la Streptokinase est déterminée in vitro, ce qui permet de calculer la dose initiale à injecter en vue de neutraliser les antistreptokinases naturelles : cette dose d'attaque est administrée sous la forme d'une perfusion rapide (en 15 à 30 mn) en association avec de l'hémisuccinate d'hydrocortisone. Elle est suivie d'une perfusion continue de Streptokinase à raison de 100 000 à 150 000 U. Christensen/heure pendant 48 à 72 heures. Vers la 24e heure, on associe, dès que les explorations biologiques l'autorisent, l'héparinothérapie sous forme d'injections discontinues ou d'une perfusion continue. En particulier, les critères biologiques qui dictent l'introduction de l'héparine sont ceux qui font l'objet de notre étude et qui concernent essentiellement la fibrinoformation (temps de thrombine, courbe de polymérisation de la fibrine, dosage du fibrinogène par gravimétrie et chronométrie) (155).

En effet, le traitement thrombolytique induit des troubles très important de la fibrinoformation dus à la présence de produits de dégradation de la fibrine (P.D.F.) (66 - 117 - 136 - 168). Ce phénomène, mis en évidence tout d'abord par NIEWIAROWSKI et KOWALSKI en 1958, a ensuite été confirmé par les travaux de FLETCHER et de BANG.

En 1958 NIEWIAROWSKI démontre que les produits de dégradation de la fibrine ont une action antithrombique

importante (134 - 167). C'est l'antithrombine VI de NIEWIAROWSKI.

Plus tardivement FLETCHER et BANG (9 - 99) localisent le trouble au stade de la polymérisation.

Enfin, très récemment, une étude biochimique faite in vitro par FLETCHER (49) montre l'existence de P.D.F. de poids moléculaire différent selon l'intensité de la dégradation du fibrinogène (quantité d'agent thrombolytique et durée d'incubation variables). L'action antithrombique est d'autant plus prononcée que le poids moléculaire des produits de dégradation du fibrinogène est plus élevé.

A) **ETUDE IN VITRO.**

Nous avons essayé dans une première étape de reconnaître in vitro les anomalies constatées par ces auteurs afin de pouvoir les rapprocher des troubles essentiellement liés à une anomalie de la structuration du caillot enregistrée chez les malades traités par la Streptokinase.

1° PREPARATION DES PRODUITS DE DEGRADATION.

Nous avons préparé des produits de dégradation de la fibrine par incubation de fibrinogène humain Kabi avec des quantités variables de plasmine et pendant des temps différents (10 - 101 - 120 - 135).

A la fin du temps d'incubation, la réaction est bloquée par l'introduction de quantités appropriées d'inhibiteur de KUNITZ (*).

Nous avons ainsi obtenu des produits de taille moléculaire variable, tout le fibrinogène ayant cependant été dégradé. Le stade de dégradation enzymatique du fibrinogène auquel correspondent les produits ainsi obtenus a été défini par quatre critères (139) **(tableau XXXIX).**

(*) Iniprol - Laboratoire CHOAY - Paris.

— le mode de préparation (59) ;

— la spécificité immulogique, déterminée par immuno-électrophorèse en présence de sérum de lapin anti-fibrinogène humain (47 - 58 - 95 - 138) ;

— les caractères de précipitation :

- par le sulfate d'ammonium à 25 % de saturation ;
- par la chaleur à 56° C pendant 30 minutes.

	Produits de haut poids moléculaire	Produits intermédiaires	Produits de bas poids moléculaire
Mode de préparation	1 ml de fibrinogène humain Kabi à 3 g/l incubé 5 minutes avec 0,15 unité de plasmine novo	1 ml de fibrinogène humain Kabi à 3 g/l incubé 5 minutes avec 3 unités de plasmine novo	1 ml de fibrinogène humain Kabi à 3 g/l incubé 15 minutes avec 10 unités novo de plasmine
Critère immunologique	Fragments X-Y-D-E	Fragments D-E	Fragments D-E
Précipitation par le sulfate d'ammonium à 25 % de saturation	Précipitation + + +	Précipitation +	Absence de précipitation
Précipitation à 56° C	Précipitation	Absence de précipitation	Absence de précipitation

TABLEAU XXXIX : PRODUITS DE DEGRADATION DU FIBRINOGENE.

2° INFLUENCE DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA FIBRINE SUR LE DOSAGE DU FIBRINOGENE.

Nous avons étudié l'influence des produits de dégradation sur la détermination du taux de fibrinogène selon les différentes techniques exposées dans le chapitre II. Les résultats sont schématisés par le tableau ci-dessous **(tableau XL).**

	Technique gravimétrique (en g/l)	Technique au sulfate d'ammonium(en g/l)	Technique p. précipitation à 56° C (en g/l)	Technique chronométrique Von Clauss (en g/l)
Plasma dilué au 1/2 avec du sérum physiologique	1,30	1,30	1,30	1,30
Plasma dilué au 1/2 avec des produits de haut poids moléculaire	1,55 *	2,30	2,30	0,55
Plasma dilué au 1/2 avec produits intermédiaires	1,30	1,75	1,30	0,60
Plasma dilué au 1/2 avec produits de bas poids moléculaire	1,30	1,30	1,30	0,75

TABLEAU XL : INFLUENCE DES DIFFERENTS PRODUITS DE DEGRADATION DU FIBRINOGENE SUR LE DOSAGE DU FIBRINOGENE.

(*) Le dosage pondéral est entaché d'une erreur par excés, du fait de la coagulation du fragment X.

Si les techniques de dosage du fibrinogène, gravimétrique ou par précipitation par le sulfate d'ammonium ou par la chaleur à 56° C ne sont pas à retenir chez les sujets soumis à un traitement thrombolytique, le dosage chronométrique par la méthode de VON CLAUSS (49) semble, par contre, mieux refléter le taux de fibrinogène physiologiquement actif car il est plus en rapport avec l'aspect friable du caillot et la valeur de l'amplitude maximale du thromboélastogramme.

3° INFLUENCE DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA FIBRINE SUR LE TEMPS DE THROMBINE ET SUR LE TEMPS DE REPTILASE (49 - 59 - 68 - 77 - 102).

A une quantité constante de plasma (0,3 ml) nous avons ajouté des doses croissantes de produits de dégradation de la fibrine sous un volume fixe de 0,3 ml aboutissant à des concentrations finales de 8 - 16 - 33 et 50 %. Les dilutions ont été effectuées dans une solution de plasmine neutralisée par de l'Iniprol. Pour chacune de ces méthodes nous avons effectué un temps de thrombine et de REPTILASE.

Le témoin, qui doit être exempt de produits de dégradation, est constitué par du plasma dilué au demi dans du sérum physiologique et mis en présence d'une solution de plasmine neutralisée par de l'Iniprol dans le but d'éviter une protéolyse. Comme le montre le **tableau XLI** les produits de dégradation de haut poids moléculaire allongent plus le temps de thrombine d'un plasma témoin que les produits intermédiaires ou de bas poids moléculaire.

	TEMPS DE THROMBINE (en sec.)		
	Produits de haut poids moléculaire	Produits intermédiaires	Produits de bas poids moléculaire
Concentration en PDF dans le plasma témoin (%)			
0 (contrôle)	28	34	38
8	31	35	39
16	35	37	40
32	80 (mauvais caillot)	47	41
50	> 90	45	42

TABLEAU XLI : INFLUENCE DES P.D.F. SUR LE TEMPS DE THROMBINE.

Les temps de coagulation par la REPTILASE effectués sur ces mêmes prélèvements donnent des résultats exactement superposables.

4° INFLUENCE DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA FIBRINE SUR LES COURBES DE POLYMERISATION EFFECTUEES EN PRESENCE DE THROMBINE OU DE REPTILASE.

Les techniques utilisées ont été exposées au chapitre II.

Pour cette étude, on ajoute 0,10 ml de P.D.F. aux 3 ml de plasma dilué au 1/10. Les produits de dégradation provoquent un allongement de la phase de polymérisation, donnant à la courbe un aspect étiré caractéristique. La densité optique finale est peu modifiée, parfois même légèrement augmentée. (Cette augmentation paradoxale de densité optique traduit vraisemblablement la coagulation du fragment X).

Les produits de dégradation selon leur taille perturbent de façon plus ou moins prononcée la fibrinoformation d'un plasma normal comme le montrent les **tableaux XLII** et **XLIII.**

	Plasma témoin	Plasma témoin + P.D.F. haut poids moléculaire	Plasma témoin + P.D.F. intermédiaires	Plasma témoin + P.D.F. de faible poids moléculaire
Temps de monomérisation	30 sec.	2 mn	1 mn 15 sec.	45 sec.
Temps de polymérisation	1 mn 30 sec.	5 mn	3 mn	2 mn
Densité optique finale	0,145	0,165	0,135	0,135

TABLEAU XLII : INFLUENCE DES P.D.F. SUR LES COURBES DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE, EN PRESENCE DE THROMBINE.

	Plasma témoin	Plasma témoin + P.D.F. de haut poids moléculaire	Plasma témoin + P.D.F. intermédiaires	Plasma témoin + P.D.F. de faible poids moléculaire
Temps de monomérisation	1 mn 45 sec.	5 mn	3 mn	2 mn 15 sec.
Temps de polymérisation	2 mn 30 sec.	10 mn	6 mn	3 mn
Densité optique finale	0,150	0,165	0,150	0,150

TABLEAU XLIII : INFLUENCE DES P.D.F. SUR LES COURBES DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE, EN PRESENCE DE REPTILASE.

Remarque : avec des quantités plus importantes de P.D.F. de haut poids moléculaire, le trouble est très prononcé.

Les phases de monomérisation et de polymérisation sont parfois si prolongées que l'on atteint difficilement la densité optique finale. De plus, les caillots obtenus sont de mauvaise qualité.

En conclusion : en accord avec les travaux de FLETCHER, tous les résultats reportés ci-dessus montrent que les P.D.F.

de haut poids moléculaire inhibent beaucoup plus la fibrinoformation d'un plasma normal que les P.D.F. intermédiaires ou de bas poids moléculaire.

5° LOCALISATION DU TROUBLE DE LA FIBRINOFORMATION.

Nous avons alors poursuivi notre investigation pour déterminer à quel stade de la fibrinoformation se produisait l'inhibition.

Pour cela nous avons préparé une solution beaucoup plus concentrée de produits de dégradation de la fibrine (P.D.F.) à partir de fibrinogène humain Kabi à 10 mg/ml, afin de ne pas méconnaître une action antithrombique faible **(tableau XLIV).**

La protéolyse a été induite par la SK ou par la plasmine.

Mode de préparation	1 ml fibrinogène humain Kabi à 10 mg/l + 0,5 unités novo de plasmine 5 mn d'incubation puis 140.000 u d'Iniprol	1 ml fibrinogène humain Kabi à 10 mg/ml + 25 u de S.K. 30 mn d'incubation puis 40.000 u d'Iniprol	1 ml fibrinogène humain Kabi à 10 mg/ml + 25 u de S.K. 4 heures d'incubation puis 40.000 unités d'Iniprol
Caractère immunologique	fragments X.Y.D.E.	fragments X.Y.D.E.	fragments D.E.
Temps de thrombine du plasma normal + P.D.F. à parties égales	> 120 sec. (Plasma témoin dilué au 1/2 dans du sérum physio. = 20 sec.)	> 120 sec. (Plasma témoin dilué au 1/2 dans le sérum physio. = 20 sec.)	55 sec. (Plasma témoin dilué au 1/2 dans le sérum physiol. = 20 sec.)

TABLEAU XLIV : TROUBLES DE LA FIBRINOFORMATION INDUITS PAR DES DOSES FORTES DE P.D.F.

Nous avons pris le soin de vérifier au préalable que les P.D.F. ne renfermaient plus d'activité plasminique résiduelle, pouvant interférer par leur action estérasique avec le dosage de la thrombine. Pour cela, l'absence d'activité fibrinolytique a été contrôlée sur des plaques de fibrine.

a) RECHERCHE D'UNE ACTION ANTITHROMBIQUE : THROMBINE TESTEE AVEC L'ESTER ETHYLIQUE DE LA BENZOYL ARGININE (B.A.E.E.) :

Cette technique permet de mettre en évidence, à l'aide d'une méthode chimique, une action anti-estérasique éventuelle, celle-ci étant considérée comme parallèle à l'action antithrombique.

L'expérimentation a été conduite à l'aide de deux techniques proposées dans le chapitre précédent.

α) Technique spectophotométrique de SCHWERT et TAKENAKA

Les résultats obtenus sont les suivants **(tableau XLV) :**

	Variation de D.O. en 10 mn
3,2 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml thrombine à 10 u/ml	0,025
3,2 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml thrombine à 25 u/ml	0,060
3,2 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml thrombine à 50 u/ml	0,120
3 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml thrombine à 25 u/ml + 0,20 ml de P.D.F. (S.K. 30 mn, S.K. 4 h ou plasmine)	0,060
3,1 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,20 ml P.D.F.	0

TABLEAU XLV : ABSENCE D'ACTIVITE ANTITHROMBIQUE DES P.D.F.

La dernière détermination a pour but de vérifier qu'il n'y a pas d'activité plasminique résiduelle, qui aurait échappé au contrôle sur plaque de fibrine. En effet, la plasmine a également sur le B.A.E.E. une action estérasique qui peut être confondue avec l'activité thrombique (170).

Les résultats de cette expérience montrent que les produits de dégradation ne modifient pas l'action estérasique de la thrombine vis-à-vis du substrat synthétique B.A.E.E.

Toutefois, nous avons noté, au cours de ces essais, que, lorsque les produits de dégradation sont préparés avec de la plasmine, à dose beaucoup plus importante que celle

utilisée précédemment (1,5 unité Novo/ml de fibrinogène humain Kabi à 10 mg/ml), il demeure une activité estérasique résiduelle quelle que soit la quantité d'Iniprol ajoutée. Il est probable que la plasmine renferme des impuretés douées d'un pouvoir estérasique qui n'est pas neutralisable par l'inhibiteur de KUNITZ.

Les résultats obtenus au cours de cette dernière expérience sont figurés dans le **tableau XLVI.**

		Variation de la densité optique en 10 mn
Courbe d'étalonnage de la thrombine	3,2 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml de thrombine à 10 u/ml	0,025
	3,2 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml de thrombine à 25 u/ml	0,060
	3,2 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml de thrombine à 50 u/ml	0,120
Dosage	3 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml de thrombine à 25 u/ml 0,2 ml P.D.F.	0,074
Contrôle	3 ml tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,2 ml P.D.F.	0,014

TABLEAU XLVI : ABSENCE D'ACTIVITE DES P.D.F., A FORTES DOSES, SUR LE POUVOIR ESTERASIQUE DE LA THROMBINE VIS-A-VIS DU B.A.E.E.

Dans la réaction témoin, qui ne fait intervenir que le B.A.E.E. et la préparation de produits de dégradation du fibrinogène, la variation de la densité optique en l'absence de thrombine n'est pas nulle, mais égale à 0,014.

Ce résultat ne peut s'expliquer que par une pureté insuffisante de la plasmine utilisée. La même réaction en présence de thrombine montre que la variation de densité optique = 0,074 correspond en réalité à l'action estérasique de la thrombine d'une part = 0,060 et à celle des impuretés de la plasmine d'autre part = 0,014.

Dans ces conditions, les P.D.F. ne possèdent aucune action antithrombique propre vis-à-vis du substrat utilisé (le B.A.E.E.).

β) *Technique au pH Stat*

Dans la méthode précédente, la légère opacité que provoquent les P.D.F., diminuant la sensibilité de l'appareil lors de la mesure cinétique de la variation de densité optique, nous avons préféré recourir à la technique au pH stat.

Rappelons qu'elle consiste à étudier la quantité de soude N/1000 à introduire (0,12 ml/mn) pour maintenir le pH constant à 7,4 lors de l'hydrolyse de 0,2 ml de B.A.E.E. 2×10^{-2} M par 0,1 ml de solution de thrombine à 5,4 unités internationales/ml. L'adjonction de 0,2 ml de P.D.F. (obtenus par dégradation du fibrinogène par la plasmine porcine ou la SK) n'entraîne pas d'utilisation de soude supplémentaire.

Cependant, comme dans la technique précédente, lorsque la dégradation du fibrinogène est effectuée avec de la plasmine très concentrée (1,5 u de plasmine Novo/ml de fibrinogène), on observe « une pente d'hydrolyse » du B.A.E.E. légèrement accentuée malgré une neutralisation par de très fortes doses d'inhibiteur de KUNITZ. La même interprétation s'applique certainement à cette action parasite liée à la présence d'impuretés dans la plasmine.

Ici encore l'épreuve de contrôle effectuée par hydrolyse du B.A.E.E. sous l'influence des P.D.F. sans adjonction de thrombine permet d'établir la correction pour la détermination de l'activité antithrombique.

Ainsi, pour 0,2 ml de B.A.E.E. 0,02 M et 0,1 ml de thrombine (5,4 u/ml) en 3 minutes, il a fallu ajouter 0,36 ml de soude N/1000 pour maintenir le pH à 7,40. L'apport de 0,2 ml de produits de dégradation, obtenus par action de la plasmine à haute dose, entraîne l'utilisation de 0,40 ml de soude N/1 000 en 3 minutes. Cependant, dans une réaction témoin pratiquée avec 0,2 ml de B.A.E.E. et 0,2 ml de produits de dégradation, il a fallu 0,04 ml de soude en 3 minutes pour maintenir le pH constant.

La différence entre ces deux dernières déterminations permet de n'avoir à tenir compte que de l'action des produits de dégradation du fibrinogène sur la thrombine, action strictement nulle vis-à-vis d'un substrat synthétique.

γ) *Conclusion :*

Les produits de dégradation du fibrinogène n'ont pas

d'action antithrombique lorsque la thrombine est testée avec un substrat synthétique tel que le B.A.E.E.

Cependant nous pensons que cette expérience ne permet pas de conclure à l'absence d'activité antithrombique lorsque la thrombine est testée avec le substrat réel de la réaction, c'est-à-dire le fibrinogène. En effet :

— nous avons vu que l'affinité de la thrombine pour les P.D.F. est inférieure à celle qu'elle présente pour le B.A.E.E.

— par contre, il est possible que les produits de dégradation et le fibrinogène restent en compétition dans leur affinité pour la thrombine. Dans ce cas les produits de dégradation posséderaient une action antithrombique.

D'ailleurs LATALLO (97), en 1964, ayant comparé :

— d'une part, les courbes de polymérisation des monomères normaux de fibrine additionnés ou non de P.D.F. (ce qui explore ainsi les antipolymérases éventuelles) ;

— d'autre part, les courbes de polymérisation effectuées à partir d'un plasma normal additionné ou non de P.D.F. (ce qui explore ainsi les antithrombines vraies et les antipolymérases éventuelles),

conclut que les P.D.F. possèdent ces deux propriétés antithrombique et antipolymérase. Nous avons repris les mêmes expériences afin de retrouver ces deux actions.

L'action antithrombique n'étant extériorisée qu'à la lumière d'expériences portant sur l'étude de la polymérisation, nous étudierons donc successivement l'inhibition de la polymérisation, puis celle de la thrombine.

b) RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIPOLYMERASE DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA FIBRINE.

Les produits de dégradation de la fibrine (fragments X, Y, D et E) retardent la polymérisation des monomères de fibrine comme le prouvent les épreuves ci-dessous :

α) *Etude effectuée à partir des monomères préparés selon DONNELLY et LATALLO.*

Dans ce premier protocole les monomères sont préparés selon la technique de DONNELLY modifiée par LATALLO (exposé au chapitre II) et l'on étudie l'inhibition de leur agrégation sous l'effet de deux doses différentes de P.D.F., comme le montre le **tableau XLVII.**

	Variation de D.O. en fonction du temps (en mn)									
	0	2 mn	4 mn	6 mn	8 mn	10 mn	15 mn	20 mn	25 mn	30 mn
0,1 ml monomères 1,6 ml tampon Imidazole = réaction témoin	0	0,100	0,190	0,240	0,260	0,300	0,315	0,325	0,328	0,330
0,1 ml monomères 0,05 ml P.D.F. 1,55 ml tampon Imidazole	0	0,015	0,045	0,105	0,165	0,220	0,275	0,335	0,345	0,355
0,1 ml monomères 0,10 ml P.D.F. 1,50 ml tampon Imidazole	0	0	0,025	0,075	0,130	0,185	0,235	0,285	0,325	0,365

TABLEAU XLVII : ACTIVITE ANTIPOLYMERASE DES P.D.F. (MONOMERES PREPARES SELON LA TECHNIQUE DE DONNELLY ET LATALLO).

β) *Etude effectuée à partir des monomères préparés selon RATNOFF.*

Dans ce deuxième groupe d'expériences les monomères sont préparés selon la technique de RATNOFF et l'on étudie :

— soit la vitesse de polymérisation des monomères à des temps variables de leur préparation, en présence ou non des produits de dégradation, comme le montre le **tableau XLVIII** (technique exposée au chapitre II) ;

— soit la polymérisation de 0,5 ml de monomères au stade final de leur formation en présence ou non de produits de dégradation de la fibrine utilisés à deux concentrations différentes (technique au chapitre II).

Les résultats sont transcrits dans les trois **tableaux XLIX.**

	Temps d'incubation en mn, lors de la formation des monomères						
	3	4	5	6	7	8	9
0,2 ml monomères pH 5 0,1 ml sérum physio. 0,2 ml d'hirudine (0,75 u/ml) pH 9,6	45 sec.	27 sec.	20 sec.	15 sec.	14 sec.	8,5 sec.	8,5 sec.
0,2 ml monomères pH 5 0,1 ml P.D.F. 0,2 ml d'hirudine (0,75 u/ml) pH 9,6	45 sec.	45 sec.	35 sec.	28 sec.	25 sec.	25 sec.	25 sec.

TABLEAU XLVIII : ACTIVITE ANTIPOLYMERASE DES P.D.F. (MONOMERES PREPARES SELON LA TECHNIQUE DE RATNOFF).

0,5 ml monomères 0,15 ml sérum pysiol.	
Temps de polymérisation	Var. D.O.
5 sec.	0
10 sec.	0,015
30 sec.	0,035
60 sec.	0,070
90 sec.	0,075
120 sec.	0,077
150 sec.	0,078

0,5 ml monomères 0,15 ml P.D.F. 1/3	
Temps de polymérisation	Var. D.O.
5 sec.	0
30 sec.	0
45 sec.	0,010
60 sec.	0,040
75 sec.	0,060
90 sec.	0,070
105 sec.	0,080
120 sec.	0,087
150 sec.	0,094
180 sec.	0,096

0,5 ml monomères 0,15 ml P.D.F. 1/2	
Temps de polymérisation	Var. D.O.
5 sec.	0
2 mn	0,005
3 mn	0,010
4 mn	0,025
5 mn	0,035
6 mn	0,055
7 mn	0,070
8 mn	0,077
9 mn	0,084
12 mn	0,094
14 mn	0,096

TABLEAU XLIX : ACTIVITE ANTIPOLYMERASE DES P.D.F. MISE EN EVIDENCE A L'AIDE DE LA TECHNIQUE PHOTOMETRIQUE.

γ) *Conclusion :*

En conclusion : tous ces résultats concordent pour

démontrer que les produits de dégradation inhibent le stade de l'agrégation des monomères de fibrine.

c) RECHERCHE D'UNE ACTION ANTITHROMBIQUE EVENTUELLE : THROMBINE TESTEE AVEC LE FIBRINOGENE.

Si l'on compare, comme LATALLO, les courbes d'agrégation des monomères normaux de fibrine, additionnés ou non de produits de dégradation (technique de RATNOFF - résultats exposés dans le **tableau XLIX)** avec les courbes de polymérisation effectuées à partir de plasma dans les mêmes conditions de dilution, de pH et de force ionique, en présence ou non de produits de dégradation (voir résultats **tableau L**), on constate que :

l'apport de ces P.D.F. perturbe beaucoup plus la fibrinoformation lorsque celle-ci a lieu au sein du plasma que lorsqu'elle intéresse la solution monomères (voir **figure 17**).

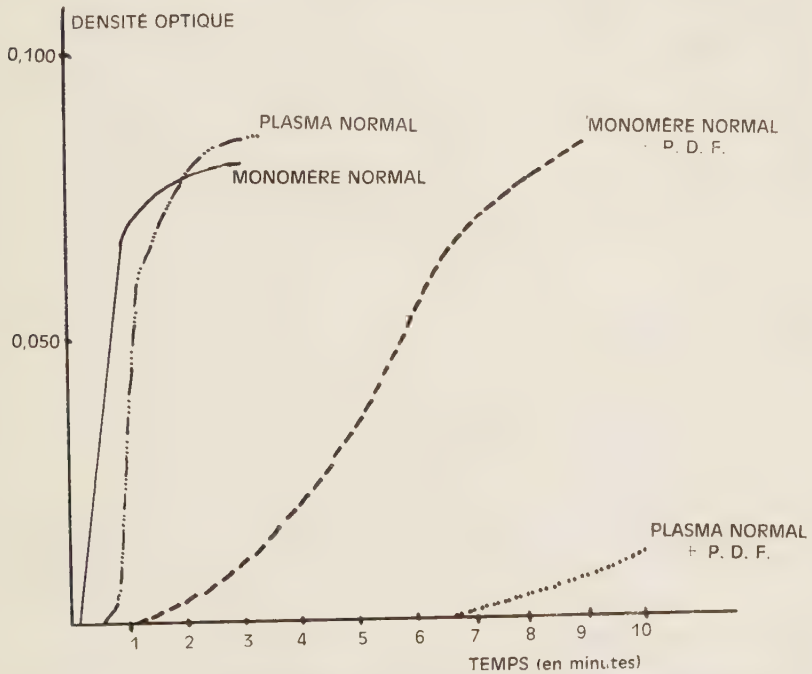


FIGURE 17 : INFLUENCE DES P.D.F. SUR LA FIBRINOFORMATION.

Cette différence de comportement plaide en faveur de l'existence d'une action antithrombique vraie associée à l'action antipolymérase des P.D.F.

— 0,5 ml plasma dilué au 1/3 dans un tampon Michaelis pH 7,4 — 1 ml de sérum phys. — 0,5 ml tampon Michaelis pH 7,4 — 0,1 ml thrombine à 17 u/ml		— 0,5 ml plasma dilué au 1/3 dans un tampon Michaelis pH 7,4 — 0,85 ml sérum phys. — 0,15 ml P.D.F. dilué 1/3 — 0,5 ml tampon Michaelis pH 7,4 — 0,1 ml thrombine à 17 u/ml		— 0,5 ml plasma dilué au 1/3 dans un tampon Michaelis pH 7,4 — 0,85 ml sérum phys. — 0,15 ml P.D.F. au 1/2 — 0,5 ml tampon Michaelis pH 7,4 — 0,1 ml thrombine à 17 u/ml	
Temps de polymérisation	Var. D.O.	Temps de polymérisation	Var. D.O.	Temps de polymérisation	Var. D.O.
30 sec.	0	30 sec.	0	30 sec.	0
45 sec.	0,003	3 mn 30 sec.	0,003	3 mn	0
1 mn	0,04	4 mn	0,008		
1 mn 15 sec.	0,065	4 mn 30 sec.	0,012		
1 mn 30 sec.	0,075	5 mn	0,020		
1 mn 45 sec.	0,078	6 mn	0,025	6 mn	0
2 mn	0,080	7 mn	0,030		
2 mn 30 sec.	0,083	8 mn	0,035	8 mn	0,005
3 mn	0,085	10 mn	0,047	10 mn	0,012
3 mn 30 sec.	0,085	15 mn	0,053		
		20 mn	0,063		
		26 mn	0,065		
		Obtention d'un caillot de mauvaise qualité		Pas de caillot	

TABLEAU L : POLYMERISATION DU FIBRINOGENE PLASMATIQUE AVEC OU SANS P.D.F.

B) ETUDE IN VIVO.

Nous avons essayé d'établir un rapport entre les anomalies enregistrées concernant (156) :

— d'une part l'intensité de la défibrination et les troubles de structuration du caillot étudiés en particulier par le temps de thrombine, la courbe de polymérisation de la fibrine, l'amplitude maximale des thromboélastogrammes ;

— et d'autre part les accidents hémorragiques imputables éventuellement à ces troubles.

En effet, la tendance hémorragique est liée essentiellement à la présence des produits de dégradation plus même qu'à l'hypofibrinémie.

1° EVALUATION DU TAUX DE FIBRINOGENE - PROBLEMES POSES PAR SON EVALUATION.

Le taux de fibrinogène s'abaisse très rapidement dès les premières heures du traitement, puis il tend à se relever plus ou moins rapidement du fait de l'arrêt ou de l'extrême ralentissement de la défibrination, liée à l'épuisement du plasminogène. L'activité fibrinolytique disparaît en effet rapidement vers la 4e ou la 8e heure du traitement par les fortes doses de SK.

Mais, comme le laissaient prévoir nos expériences in vitro, les taux de fibrinogène obtenus à l'aide de la méthode pondérale et de la méthode chronométrique, voisins avant le traitement, vont ensuite s'écarter, les produits de dégradation influençant beaucoup plus les résultats de la méthode chronométrique que ceux de la méthode pondérale **(tableau LI).**

HEURE DU TRAITEMENT	FIBRINOGENE PONDERAL	FIBRINOGENE (méthode de VON CLAUSS
0 h	5,50 g/l	5,50 g/l
6 h	2,60 g/l	1 g/l
17 h	2 g/l	0,90 g/l
20 h (héparine)	1,90 g/l	0,75 g/l
30 h		
58 h (arrêt du traitement)	1,70 g/l	
72 h	3,20 g/l	2,40 g/l

TABLEAU LI : TAUX DE FIBRINOGENE : PROBLEMES POSES PAR SON EVALUATION.

2° AMPLITUDE MAXIMALE DU THROMBOELASTOGRAMME (76).

Dès les premières heures du traitement par la SK, l'amplitude maximale du tracé s'effondre pour atteindre des valeurs de 30 à 40 mm, et parfois même moins.

Cette réduction de l'amplitude maximale traduit non seulement l'hypofibrinémie mais aussi le trouble de la structuration lié à la présence de produits de dégradation de la fibrine.

En effet, ces derniers réduisent la solidité du caillot. In vitro, le caillot, réduit de volume (hypofibrinémie) et de consistance moins ferme que normalement, laisse échapper un grand nombre de globules rouges, qu'il est impuissant à retenir dans ses mailles. Le phénomène se retrouve au T.E.G. sous la forme de tracés dont l'évolution est souvent irrégulière et l'amplitude maximale est abaissée **(figure 18** et **tableau LII).**

FIGURE 18 : EXEMPLE DE DIAGRAMME DE T.E.G. CHEZ UNE MALADE TRAITEE A LA S.K.

Heure du traitement	Fibrinogène pondéral	Amplitude maximale
0 h	7 g/l	72 mn
7 h	3,60 g/l	18 mn
13 h	3,20 g/l	26 mn
24 h	2,20 g/l	17 mn
32 h	2,20 g/l	
47 h	2,10 g/l	42 mn

TABLEAU LII : AMPLITUDE MAXIMALE DU THROMBOELASTOGRAMME - TAUX DE FIBRINOGENE ET HEURE DU TRAITEMENT PAR LA STREPTOKINASE.

Fait intéressant, l'amplitude maximale enregistrée chez différents malades s'accorde mieux avec le taux de fibrinogène évalué par la méthode chronométrique qu'avec celui obtenu par la méthode pondérale, ce qui indique que seule la première de ces deux méthodes dose le fibrinogène physiologiquement actif.

3° TEMPS DE THROMBINE.

Le temps de thrombine, qui est influencé à la fois par la présence des produits de dégradation de la fibrine et par l'hypofibrinémie lorsque cette dernière est importante, constitue l'élément essentiel de cette exploration.

Nous avons constaté un allongement du temps de thrombine apparaissant rapidement après le début du traitement, parallèle à la poussée de fibrinolyse initiale.

Habituellement, après l'épuisement du plasminogène, qui entraîne la disparition de l'activité fibrinolytique circulante, le temps de thrombine a tendance à se raccourcir, sans toutefois revenir à la normale **(tableau LIII)**.

Heure du traitement	Temps de thrombine malade/témoin
0 h	21 sec./18 sec.
7 h	42 sec./20 sec.
13 h	52 sec./20 sec.
24 h	41 sec./18 sec.
32 h (+ héparine)	(+ bleu) 45 sec./30 sec.
47h	(+ bleu) 47 sec./30 sec.
72 h	28 sec./21 sec.

TABLEAU LIII : ALLONGEMENT DU TEMPS DE THROMBINE CHEZ LES MALADES TRAITES PAR LA S.K.

Lorsque le traitement comporte également de l'héparine, c'est au temps de thrombine corrigé par le bleu de toluidine ou au temps de REPTILASE qu'il convient d'avoir recours pour différencier ce qui revient à l'héparine d'une part, aux produits de dégradation associés essentiellement à l'hypofibrinémie d'autre part.

4° COURBES DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE.

Au cours de ces traitements par de fortes doses de SK, nous avons étudié chez de nombreux malades l'évolution de la polymérisation et observé habituellement que l'inhibition de la polymérisation par les produits de dégradation se traduisait par un aplatissement et un étirement anormalement prolongé des courbes.

La baisse de la D.O. maximale correspond surtout à l'hypofibrinémie tandis que l'étirement correspond au trouble de la polymérisation. L'anomalie est présentée ci-dessous par deux séries de courbes :

— l'une est effectuée avec la thrombine **(figure 19) ;**

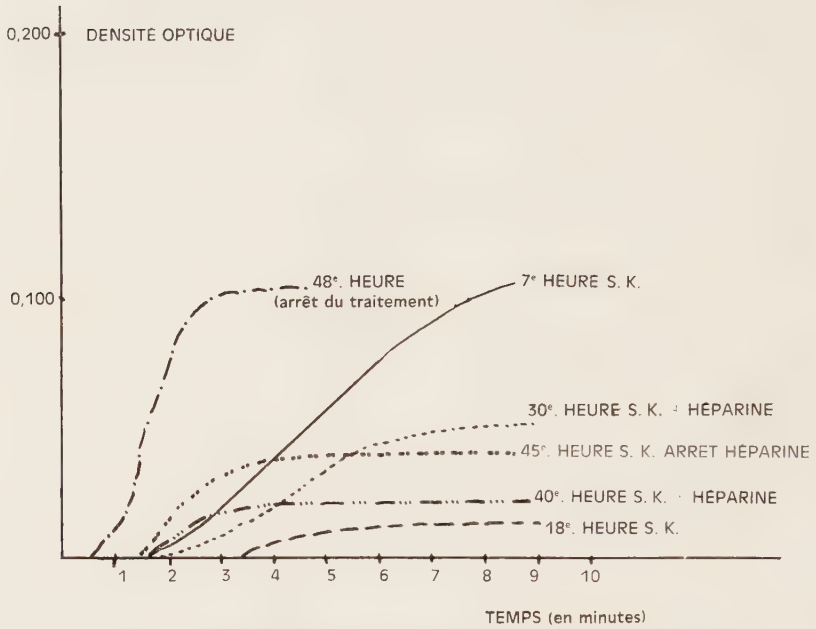


FIGURE 19 : COURBES DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE CHEZ LES MALADES TRAITES PAR LA S.K. (COURBES EFFECTUEES AVEC LA THROMBINE).

— l'autre est effectuée avec la REPTILASE **(figure 20).**

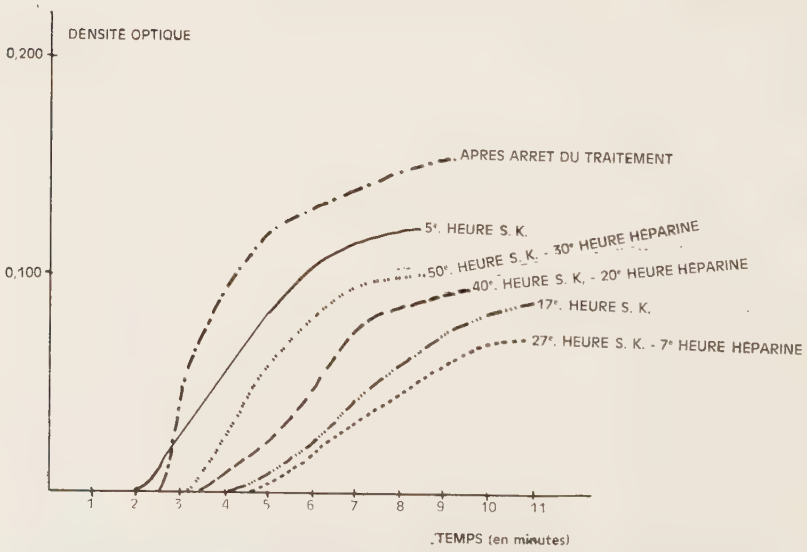


FIGURE 20 : COURBES DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE CHEZ LES MALADES TRAITES PAR LA S.K. (COURBES EFFECTUEES AVEC LA REPTILASE).

Le trouble, qui est marqué dès les toutes premières heures du traitement, s'accentue pour atteindre son maximum entre la 18e heure et la 36e heure, puis s'atténue habituellement malgré la poursuite du traitement. Pendant la période où le malade reçoit la SK et l'héparine, nous avons substitué la REPTILASE à la thrombine de façon à éviter toute interférence de l'héparine sur la polymérisation.

5° INCIDENCE HEMORRAGIQUE.

Nous avons confronté les résultats de ces différentes explorations chez quelques malades afin de rechercher une explication à la tendance hémorragique.

Nous avons choisi deux exemples parmi les plus significatifs :

— Premier cas :

Les examens biologiques sont résumés dans le **tableau LIV.**

Heure du traitement	Fibrinogène		A.M. du TEG (en mm)	Temps de thrombine malade/témoin	Courbe de polymérisation	
	Pondéral	Von Clauss			D.O. max.	Temps polymérisation
0	5,50 g/l	—	70	30 sec./27 sec.	0,300	45 s.
7e h	2,60 g/l	1 g/l	44	60 sec./23 sec.	0,140	6 mn
18e h	2 g/l	0,90 g/l	47	57 sec./20 sec.	0,045	5 mn
21e h = héparine	—	—	—	— —	—	—
30e h	1,90 g/l	0,75 g/l	32	58 sec./23 sec.	0,070	5 mn 30 s.
41e h	—	—	25	50 sec./15 sec.	0,045	5 mn
58e h	1,70 g/l	—	37	— —	0,070	2 mn

TABLEAU LIV : DONNEES BIOLOGIQUES D'UN MALADE PRESENTANT UN SYNDROME HEMORRAGIQUE, AU COURS D'UN TRAITEMENT PAR LA S.K.

Dans ce cas particulier, le temps de thrombine s'est constamment montré très allongé parallèlement à un trouble profond de la polymérisation. Il faut noter également l'évolution particulière du taux de fibrinogène, qui n'est pas remonté malgré l'arrêt de la fibrinolyse.

Le trouble important et durable de la fibrinoformation explique probablement la survenue d'une hématurie vers la 56e heure du traitement.

— **Deuxième cas :**

Les résultats biologiques sont résumés dans le **tableau LV.**

Heure du traitement	Temps de thrombine en sec. mal./témoin	A.M. du TEG en mm	Fibrinogène gravimétrique	Polymérisation		
				D.O. max.	Temps de latence	Temps polymérisation
5e h 1/2 (héparine)	(+ bleu) 50/30	16	2,30 g/l	0,120	2 mn	6 mn
17e h	50/20	30	1,75 g/l	0,095	4 mn	8 mn
27e h	68/34	24	1,90 g/l	0,080	4 mn	7 mn
40e h	31/15	47	2,30 g/l	0,090	3 mn	5 mn
50e h	60/33		2,20 g/l	0,100	3 mn	4 mn
Arrêt de la S.K. à la 60e h						
65e h	44/25	47		0,150	2 mn 1/2	5 mn

TABLEAU LV : DONNEES BIOLOGIQUES D'UN MALADE TRAITE PAR LA S.K., NE PRESENTANT AUCUN ACCIDENT HEMORRAGIQUE.

L'évolution biologique de cette malade traitée selon le même protocole que le cas précédent est assez différente. En effet, comme le montre le tableau des résultats, la défibrination a été beaucoup moins marquée et l'amplitude maximale du thromboélastogramme s'est très nettement corrigée dans la deuxième partie du traitement puisqu'elle est de 47 mm à la 40e heure.

6° CONCLUSION.

Le but essentiel de cette étude de la fibrinoformation au cours du traitement par la SK étant la prévention des accidents hémorragiques, nous avons analysé les résultats en fonction de la tendance hémorragique éventuelle chez quelques malades.

Chez la plupart de ceux qui ont supporté parfaitement le traitement, il est intéressant de noter que la courbe de polymérisation montre une réduction de l'ordre de 50 % de la densité optique finale et une amplitude maximale du thromboélastogramme, qui ne s'abaisse pas en dessous de 30 mm environ.

A l'inverse dans trois autres cas sont apparus des accidents hémorragiques, respectivement hématurie isolée,

hématurie et moelena, et moelena. Chez ces malades, la densité optique maximale de la courbe de polymérisation s'est réduite jusqu'à atteindre 10 à 30 % de sa valeur initiale, tandis que l'amplitude maximale du thromboélastogramme s'effondrait en dessous de 20 mm.

Il existait parallèlement un allongement important du temps de thrombine, dépassant souvent deux fois le temps du témoin.

Il nous a semblé que l'intensité de ce trouble de la fibrinoformation, et surtout sa persistance pendant une grande partie du traitement, constituaient les éléments propres à expliquer le mieux les accidents survenus.

TROUBLES DE LA POLYMERISATION DANS UN CAS DE MYELOME

C'est à l'occasion de désordres hémorragiques graves (epistaxis abondantes) survenant chez un homme de 74 ans atteint de myélome multiple, avec paraprotéine de type IgG, que nous avons été amenée à découvrir l'anomalie de la fibrinoformation dans le cadre de cette pathologie.

A) DEPISTAGE DE L'ANOMALIE DE LA FIBRINOFORMATION.

L'exploration de la coagulation a révélé un trouble important de cette étape de l'hémostase.

1° THROMBOELASTOGRAPHIE.

Elle met en évidence une amplitude maximale basse (44 mm), compte tenu du taux de fibrinogène (4,80 g/litre) et du nombre de plaquettes (180 000/mm^3).

2° TEMPS DE THROMBINE.

Il est très allongé. De plus, l'addition du plasma ou du sérum du malade à un plasma témoin entraîne un allongement du temps de thrombine de ce dernier. Ces résultats apportent la preuve de l'existence d'un inhibiteur puissant de la fibrinoformation **(tableau LVI).**

	Temps de thrombine
Plasma témoin	19 sec.
Plasma pathologique	30 sec.
Plasma pathologique / Plasma témoin \ àa	24 sec.
Sérum pathologique / Plasma témoin \ àa	24 sec.

TABLEAU LVI : ALLONGEMENT DU TEMPS DE THROMBINE CHEZ UN MALADE ATTEINT DE MYELOME.

3° ETUDE DE LA COURBE DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE.

Elle montre un allongement du temps de latence et un abaissement de la densité optique finale (0,180), compte tenu du taux de fibrinogène (4,80 g/litre).

Cependant, lorsque la dilution du plasma pathologique est effectuée dans des solutions de faible force ionique, l'anomalie s'atténue, comme l'indique le **tableau LVII.**

	Mesure de la densité optique dans les solutions de Cl Na à concentrations variables				
	0,15 M	0,12 M	0,07 M	0,05 M	0,02 M
Témoin 5 g/l	0,270	0,465	0,500	0,530	0,540
Malade 4,80 g/l	0,180	0,335	0,410	0,545	0,540

TABLEAU LVII : POLYMERISATION DE LA FIBRINE EN FONCTION DE LA FORCE IONIQUE, EN CAS DE MYELOME.

B) RAPPORT ENTRE LA PARAPROTEINE MYELOMATEUSE ET LE TROUBLE DE LA FIBRINOFORMATION.

C'est SEEGERS qui, le premier, a décrit la présence d'une antithrombine dans le myélome (c'est l'antithrombine V).

Ensuite, d'autres auteurs ont localisé l'action de cet inhibiteur au stade de la polymérisation de la fibrine (60 - 90 - 146).

Nos propres résultats confirment ces travaux. Pour cela, nous avons démontré que la paraprotéine était bien responsable de l'anomalie rencontrée.

En effet, additionnée à un plasma témoin elle induit les troubles décrits plus haut.

1° ISOLEMENT DE LA PARAPROTEINE (*).

— Précipitation de la paraprotéine du sérum par le sulfate d'ammonium à 33 % de saturation.

— Redissolution du précipité dans de l'eau distillée.

— Dialyse contre de l'eau distillée.

— Elimination des euglobulines (qui précipitent).

— Concentration par lyophilisation de la paraprotéine du type IgG.

— Identification et vérification de la pureté de cette paraprotéine par immunoélectrophorèse.

2° EXPERIENCES AVEC L'IgG ISOLEE.

a) ACTION SUR LE TEMPS DE THROMBINE.

Plasma-témoin + tampon (àà)	29 sec.
Plasma-témoin + IgG en solution tamponnée à 70 g/litre (àa)	180 sec.
Plasma-témoin + IgG en solution tamponnée à 35 g/litre (àa)	58 sec.

b) ACTION SUR LA COURBE DE POLYMERISATION DE LA FIBRINE.

Si l'on ajoute à 1 ml de plasma normal, titrant 5 g/litre de fibrinogène, 40 mg de protéine myélomateuse, on obtient une courbe de polymérisation superposable à celle que nous avons obtenue pour le malade.

c) MODE D'ACTION DE LA PARAPROTEINE SUR LE TROUBLE DE LA FIBRINOFORMATION.

(*) Nous remercions M. François ROUSSELET, chef de laboratoire dans le service du Professeur GIRARD, de nous avoir aidée à isoler la paraprotéine.

α) *Recherche d'une action antithrombique : thrombine testée avec l'ester éthylique de la Benzoyl arginine (B.A.E.E.).*

La technique utilisée a été celle de SCHWERT et TAKENAKA (décrite au chapitre II). Les résultats obtenus, schématisés dans le tableau suivant, montrent que la protéine myélomateuse que nous avons isolée ne perturbe pas l'action estérasique de la thrombine sur le B.A.E.E. **(tableau LVIII).**

	Variation de D.O. en 10 mn
3,2 ml de tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml thrombine 10 u/ml	0,025
3,2 ml de tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml thrombine 25 u/ml	0,060
3,2 ml de tampon + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml thrombine 50 u/ml	0,120
3 ml de tampon + 0,2 ml d'IgG à 30 g/l + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml thrombine 25 u/ml	0,060
3ml de tampon + 0,2 ml d'IgG à 45 g/l + 0,05 ml B.A.E.E. + 0,10 ml thrombine 50 u/ml	0,119
(l'IgG a été dissoute dans le tampon de la réaction)	

TABLEAU LVIII : ABSENCE D'ACTIVITE INHIBITRICE DE LA PROTEINE MYELOMATEUSE SUR LA THROMBINE (ACTION ESTERASIQUE SUR LE B.A.E.E.).

β) *Recherche d'un action antipolymérase.*

La protéine myélomateuse perturbe considérablement la polymérisation des monomères et l'anomalie est d'autant plus prononcée que la quantité de protéine myélomateuse introduite est plus importante, comme le prouvent les résultats ci-dessous.

Dans un premier protocole, les monomères sont préparés selon la technique de DONNELLY, modifiée par LATALLO (décrite chapitre II) **(tableau LIX).**

	DENSITE OPTIQUE AU COURS DU TEMPS								
	0	2 mn	4 mn	6 mn	8 mn	10 mn	15 mn	20 mn	30 mn
0,1 ml monomères 1,6 ml tampon Imidazole	0	0,100	0,190	0,240	0,260	0,300	0,315	0,325	0,330
0,1 ml monomères 0,1 ml solution IgG (30 mg/ml) 1,5 ml tampon Imidazole	0	0,030	0,070	0,100	0,130	0,160	0,180	0,190	0,195
0,1 ml monomères 0,1 ml solution IgG (45 mg/ml) 1,5 ml tampon Imidazole	0	0	0,045	0,065	0,085	0,095	0,105	0,115	0,120

TABLEAU LIX : ACTIVITE ANTIPOLYMERASE
DE LA PROTEINE MYELOMATEUSE - MONOMERES PREPARES
SELON LA TECHNIQUE DE DONNELLY ET LATALLO.

Dans un second protocole, les monomères sont préparés selon la technique de RATNOFF et l'on étudie :

— soit la vitesse de polymérisation des monomères à des temps variables au cours de leur formation, en présence ou non de protéine myélomateuse comme le montre le **tableau LX** (technique, chapitre II) ;

Formation des monomères Temps d'incubation en minutes	3	4	5	6	7	8	9
0,2 ml monomères pH 5 0,1 ml sérum physiologique 0,2 ml Hirudine pH 9,6	45 sec.	27 sec.	20 sec.	15 sec.	14 sec.	8 sec.	8 sec.
0,2 ml monomères pH 5 0,1 ml protéine myélomateuse à 30 mg/ml dans le sérum physiologique 0,2 ml Hirudine pH 9,6	45 sec.	45 sec.	35 sec.	27 sec.	20 sec.	19 sec.	18 sec

TABLEAU LX : ACTIVITE ANTIPOLYMERASE
DE LA PROTEINE MYELOMATEUSE - MONOMERES PREPARES
SELON LA TECHNIQUE DE RATNOFF.
VITESSE DE POLYMERISATION DES MONOMERES EN PRESENCE
DE PROTEINE MYELOMATEUSE

— soit la polymérisation de 0,5 ml de monomères au stade final de leur formation, en présence ou non de protéine myélomateuse utilisée à deux concentrations différentes (selon la technique décrite au chapitre II) **(tableau LXI** et **figure 21).**

	DENSITE OPTIQUE AU COURS DU TEMPS (en sec.)								
	5	10	30	45	60	90	120	150	180
0,5 ml de monomères 0,15 ml de sérum phys.	0	0,015	0,055	0,065	0,070	0,075	0,077	0,078	
0,5 ml de monomères 0,15 ml de solution de IgG à 30 mg/ml	0	0	0	0,005	0,020	0,040	0,055	0,056	0,056
0,5 ml de monomères 0,15 ml de solution de IgG à 45 mg/ml	0	0	0	0	0,005	0,025	0,042	0,046	0,048

TABLEAU LXI : ACTIVITE ANTIPOLYMERASE DE LA PROTEINE MYELOMATEUSE (TECHNIQUE PHOTOMETRIQUE).

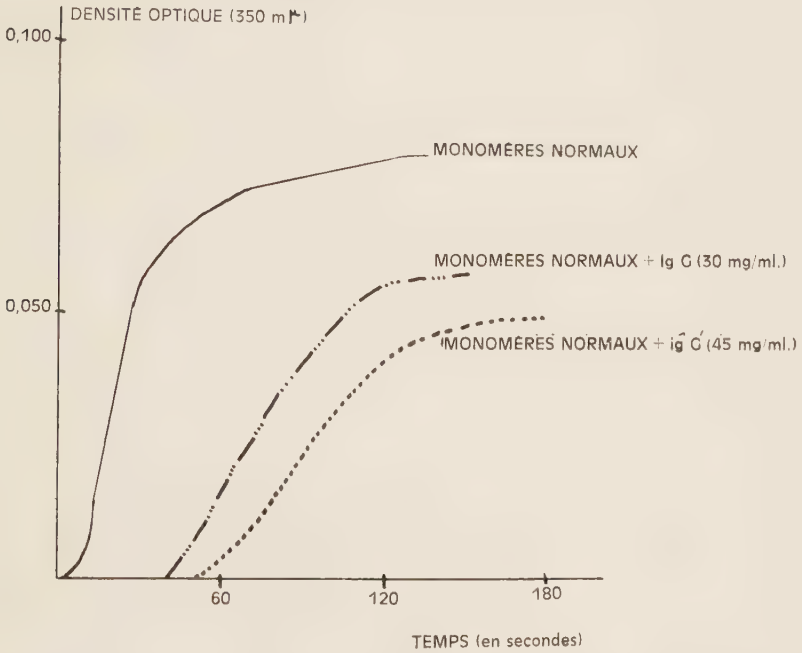


FIGURE 21 : COURBES DE POLYMERISATION DES MONOMERES DE FIBRINE NORMAUX, EN PRESENCE DE LA PROTEINE MYELOMATEUSE.

Cependant, comme nous l'avons vu précédemment à propos du mode d'action des produits de dégradation de la fibrine, les expériences réalisées avec le B.A.E.E. ne permettent pas de conclure à l'absence d'un effet antithrombique vrai lorsque la thrombine est testée sur le substrat de la réaction (le fibrinogène).

γ) *Recherche d'une action antithrombique : thrombine testée avec le fibrinogène.*

Afin de préciser le processus de l'inhibition de la fibrinoformation, nous avons comparé les dernières courbes d'agrégation des monomères préparés selon la technique de RATNOFF, avec les courbes de polymérisation effectuées à partir de plasma dans les mêmes conditions de dilution, de pH et de force ionique **(tableau LXII).**

	DENSITE OPTIQUE AU COURS DU TEMPS (en sec.)								
	45	60	90	120	180	240	270	300	360
0,5 ml plasma au 1/3 dans tampon Michaelis pH 7,4 1 ml sérum physiol. 0,5 ml tampon Michaelis pH 7,4 0,1 ml thrombine à 17 u/ml	0	0,040	0,075	0,080	0,085	0,085			
0,5 ml plasma au 1/3 0,85 ml sérum physiol. 0,15 ml d'IgG à 30 mg/ml 0,5 ml tampon Michaelis pH 7,4 0,1 ml thrombine à 17 u/ml	0	0	0,025	0,035	0,045	0,060	0,063	0,065	
05 ml plasma au 1/3 0,85 ml sérum physiol. 0,15 ml d'IgG à 45 mg/ml 0,5 ml tampon Michaelis pH 7,4 0,1 ml thrombine à 17 u/ml	0	0	0,005	0,010	0,025	0,040	0,046	0,050	0,052

TABLEAU LXII : PERTURBATION D'UNE COURBE DE POLYMERISATION DE FIBRINE PAR ADDITION DE PROTEINE MYELOMATEUSE.

Cette confrontation montre que le trouble dû à la protéine myélomateuse ne réside que dans une action antipolymérase puisque les anomalies enregistrées à propos de la polymérisation des monomères (résultats = **tableau LXI**) ne sont pas accentuées lorsque la polymérisation est effectuée au sein du plasma. La **figure 22** visualise cette confrontation

Enfin, il est intéressant de noter que ce trouble de la polymérisation retentit sur les tracés thromboélastographiques sous la forme d'une réduction de l'amplitude maximale.

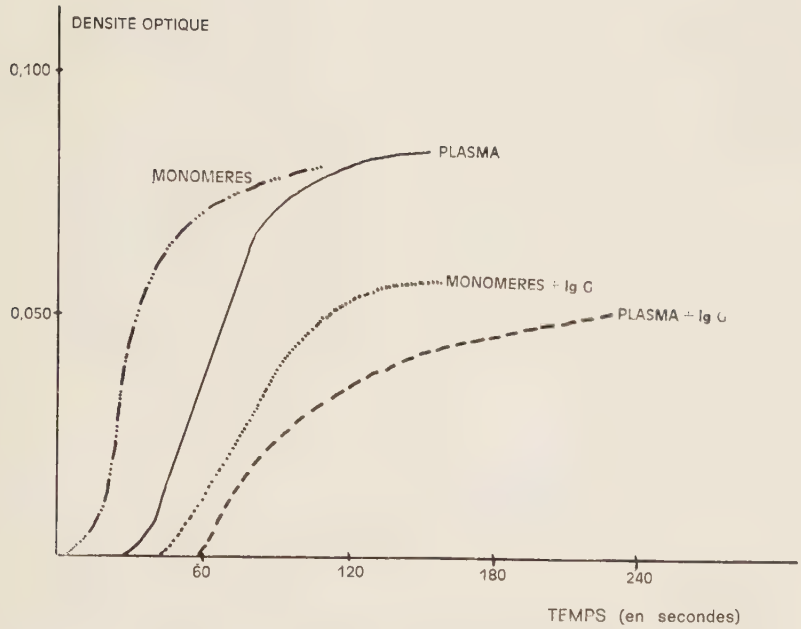


FIGURE 22 : COURBES DE POLYMERISATION. DES MONOMERES DE FIBRINE OU DE FIBRINOGENE EN PRESENCE OU EN L'ABSENCE DE PROTEINE MYELOMATEUSE.

C) CONCLUSION.

Le trouble induit par la protéine myélomateuse se résume par une anomalie isolée de la polymérisation de la fibrine. Elle est susceptible à elle seule d'entraîner des désordres hémorragiques spontanés.

L'amplitude maximale du thromboélastogramme est influencée d'une part par la richesse du milieu en fibrinogène, d'autre part par la qualité de la polymérisation des monomères de fibrine.

TAUX DE FACTEUR DE STABILISATION DE LA FIBRINE DANS DIVERS CAS PATHOLOGIQUES

A) CHEZ 100 SUJETS NORMAUX.

Le taux de FSF déterminé par les différentes techniques (exposées au chapitre II) a varié de 70 à 130 % de la normale (activité établie par rapport à un pool de plasmas témoins titrant par définition 100 % de FSF).

B) CHEZ 70 CIRRHOTIQUES.

Le taux de FSF (65 à 90 % de la normale selon les cas) n'a pas montré de variation significative.

C) CHEZ LES MALADES PRESENTANT UNE COAGULATION INTRAVASCULAIRE.

Le taux de facteur XIII était abaissé. Dans quelques cas, il était voisin de 40 à 50 %, ce qui représente une diminution significative.

Cependant, chez un patient atteint de leucose aiguë et présentant une coagulation intravasculaire ayant entraîné une mort rapide, il a existé une baisse importante du facteur XIII. Le taux de ce facteur se trouvait, en effet, à 12 % de la normale. Cette diminution est associée à un déficit portant sur différents facteurs de la coagulation.

CONCLUSION : le taux de FSF (mis à part les cas exceptionnels de déficits congénitaux) est rarement diminué, même dans les cirrhoses où l'on avait espéré trouver une relation entre son abaissement et l'atteinte hépatique, puisque le facteur XIII est probablement synthétisé au niveau du foie.

Dans le cas des coagulations intravasculaires, son déficit est probablement lié, comme celui des autres facteurs, à un mécanisme de consommation. Le comportement du FSF dans les coagulations intravasculaires pourrait être différent de celui observé dans les fibrinolyses.

CONCLUSION

On sait aujourd'hui que la fibrinoformation se fait en trois phases :

— protéolyse du fibrinogène avec libération des monomères ;

— polymérisation de ces monomères ;

— stabilisation du caillot par le facteur de stabilisation de la fibrine ou facteur XIII.

Les techniques d'exploration globale de la fibrinoformation (dosage pondéral du fibrinogène, temps de thrombine) présentent certaines insuffisances, ainsi, le dosage du fibrinogène ne tient pas compte d'éventuels produits de dégradation de la fibrine ; quant au temps de thrombine, il n'explore que la protéolyse et la polymérisation, mais non la troisième phase.

Des techniques plus spécifiques permettent d'étudier les différentes phases de la fibrinoformation :

— L'étude photométrique de la polymérisation de la fibrine, pour laquelle nous avons précisé l'influence de différents paramètres (substrat, enzyme, calcium, pH, rôle des plaquettes, vieillissement du plasma), est une technique simple d'analyse de la monomérisation et de la polymérisation.

— L'action estérasique de la thrombine peut être dissociée de l'action coagulante par l'utilisation d'un substrat synthétique tel l'ester éthylique de la benzoyl-arginine. Cette méthode nous a permis d'étudier les inhibiteurs du premier stade de la fibrinoformation.

— Parallèlement, la préparation de monomères normaux de fibrine par deux techniques différentes rend possible la mise en évidence d'inhibiteurs du deuxième stade de la fibrinoformation (polymérisation des monomères).

— Enfin, l'étude de la troisième phase de la fibrinoformation se résume au dosage du facteur XIII, lequel comporte de nombreuses difficultés. Nous avons analysé les avantages et les inconvénients des trois principales méthodes proposées : la voie biologique, la technique potentiométrique, la mesure de la tolérance à l'acide monoiodacétique.

Ces différentes techniques ont trouvé leur application pratique dans l'étude de certains troubles de la fibrinoformation provoqués par l'administration de drogues, ou liés à une tare congénitale ou acquise.

1° Troubles de la fibrinoformation provoqués par l'administration de certaines drogues,

a) Il est connu que l'héparine n'agit que sur le stade de protéolyse.

b) Le dextran et son dérivé de poids moléculaire plus faible ont une action sur la polymérisation : nous avons confirmé ces données biologiques.

c) Au cours des traitements thrombolytiques par la streptokinase (S.K.), la fibrinoformation se trouve très altérée. Les produits de dégradation de la fibrine obtenus par cet enzyme ont été étudiés in vivo et in vitro. Ils possèdent une action antipolymérase certaine. Cependant une action antithrombique associée n'est pas exclue.

Le retentissement de cette atteinte de la fibrinoformation sur les accidents hémorragiques, observés chez certains patients, a été analysé.

L'intérêt de l'examen photométrique pour suivre le traitement est souligné. Les produits de dégradation jouent également un rôle sur l'amplitude maximale du thromboélastogramme.

2° Troubles de la fibrinoformation liés à une tare congénitale ou acquise.

Au cours des deux cas de dysfibrinogénémie, que nous avons pu suivre, cette étude analytique de la fibrinoformation prend une très grande importance.

a) Chez le premier malade, l'anomalie coïncide avec un ictère grave. Elle est caractérisée par un allongement du temps de thrombine (non lié à une hypofibrinémie majeure ou à une activité antithrombique anormale) et par une absence totale d'opacification du caillot, lequel prend l'aspect d'un gel translucide. Fait remarquable, l'analyse chimique du fibrinogène, préalablement isolé, révèle une anomalie de la fraction glucidique (diminution du D Galactose et augmentation de l'acide sialique) apportant pour la première fois la preuve de l'existence d'anomalies moléculaires du fibrinogène.

b) Chez le deuxième malade, la tare est découverte fortuitement. Elle est extrêmement rare (cinquième cas de la littérature mondiale). Elle a été retrouvée chez les trois enfants. L'anomalie est transmise selon le mode dominant non lié au sexe.

Les données biologiques révèlent un allongement du temps de thrombine et du temps de REPTILASE (non lié à une antithrombine sérique), un taux de fibrinogène discordant selon les techniques utilisées (normal par la méthode pondérale, très abaissé par la méthode chronométrique).

Le fibrinogène anormal perturbe la fibrinoformation d'un plasma témoin, mais ne trouble pas la polymérisation des monomères normaux. Cette dysfibrinogénémie ne s'accompagne d'aucune tendance hémorragique ou thrombotique.

c) L'étude d'un cas de myélome a révélé l'existence d'un trouble isolé de la polymérisation de la fibrine. Nous avons pu montrer que ce dernier retentissait sur l'amplitude du diagramme thrombo-élastographique.

d) Enfin le dosage du facteur XIII (FSF) dans différents états pathologiques ne nous a permis de retenir qu'une diminution ininterprétable dans les cirrhoses hépatiques et un abaissement par consommation, souvent discret, dans les coagulations intravasculaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABILDGAARD U.
Inhibition of the thrombin-fibrinogen. Reaction by antithrombin III, studied by N-terminal analysis.
Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 1967, *20*, 207-216

2. ABILDGAARD U.
N-Terminal analysis during coagulation of purified human fibrinogen, fraction I and plasma.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1965, *17*, 529-536.

3. ABILDGAARD U.
Acceleration of fibrin polymerisation by dextran and ficoll. Interactions with calcium and plasma-proteins.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1966, *18*, 5, 518-524.

4. AMRIS A. AMRIS C.J.
Turnover and distribution of 131 Iodine labelled human fibrinogen.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1964, *11*, 3/4 404-422.

5. ARDRY R.
Micromethode rapide du fibrinogène plasmatique.
Ann. Biol. Clin. 1960, *18*, 7/9 485-488.

6. ASTRUP T., BRAKMAN P., NISSEN U.
The estimation of fibrinogen. A revision.
Scand. J. Clin. Lab. Investigations 1965, *17*, I, 57-65.

7. BAILEY K. et BETTELHEIM F.R.
The nature of the fibrinogen thrombin reaction.
Brit. Med. Bull. 1955, II, 50-55.

8. BAILEY K., BETTELHEIM F.R.
Coagulation du fibrinogène. Libération des peptides.
Biochem. Biophys. Acta 1955, *18*, 4, 495-503.

9. BANG N.U., FLETCHER A.P., ALKJAERSIG N., SHERRY S.
Pathogenesis of the coagulation deffect developping during pathological protéolytic state : III demonstration of abnormal clot structure by electron microscopy.
J. of Clin. Investig. 1962, *41*, 935-948.

10. BECK E.A., JACKSON D.P.
Studies of the degradation of human fibrinogen by plasmin and trypsin.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1966, *16*, 3/4 526-540.

11. BLOMBACK B.
On the properties of fibrinogen and fibrin.
Arkiv for Kemi, 1958, *12*, 10, 99-103.

12. BLOMBACK B., BLOMBACK M., EDMANN P. and Coll.
Human fibrinopeptids : isolation, characterization and structure.
Biochem. Biophys. Acta, 1966, *115*, 371-396.

13. BLOMBACK B., BLOMBACK M., OLSSON P.
Studies on thrombin inactivation in normal plasma, sérum and plasma fractions and its relation to heparin.
Thrombos. Diath. Haemorrh. 1963, *9*, 368-386.

14. BLOMBACK B., CARLSON L.A., FRANZEN S., and Coll.
Turnover of I^{131} labelled fibrinogen in man. Studies in normal subjects in congenital coagulation factor déficiency states, in liver cirrhosis, in polycythémia vera and in epidermolysis bulbos.
Acta med. Scand. 1966, *179*, 5, 557-574.

15. BLOMBACK B., LAURENT T.C.
N-Terminal and light scattering studies in fibrinogen and its transformation to fibrin.
Arkiv for Kemmi, 1958, *12*, 14, 137-146.

16. BLOMBACK B., YAMASHINA I.
The determination of N-Terminal amino-acids during the conversion of fibrinogen to fibrin.
Acta Chem. Scand. 1957, *11*, 1, 194-195.

17. BOMMER W., KUNZER W., SCHROER H.
Afibrinogénémie congénitale.
Ann. Paed. 1963, *200*, 46-59 et 180-234.

18. BOUVIER C.A., GRUENDLINGER J.
Etude des phénomènes de coagulation et de fibrinolyse par une méthode simple d'enregistrement optique.
Contin. Schweiz. Med. Wschr. 1963, *93*, 1401-1455.

19. BRITTEN A.F.H.
Congenital deficiency of factor XIII (fibrin-stabilizing factor). Report of a case and review of the litterature.
Am. J. Med. 1967, *43*, 751-761.

20. BROWN M.
The relationship of carbohydrate in human fibrinogen conversion to fibrin
Vox sanguins, 1963, *8*, 16, 104-105. Proceedings.

21. BULUK K., ZUCK A.
The possibility of proteolytic activation of the fibrin-stabilizing factor
Biochem. Biophys. Acta 1967, *147*, 593-594.

22. BULUK K., OLBROMSKI J., JANUSZKO T.
Desmofibrin formation and the activity of the fibrin stabilizing factor (FSF) during the cleavage of its SH groups by thrombin.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1966, *16*, 51-60.

23. BURNSTEIN M., GUINAND A.
Sur l'action antithrombique de l'héparine. Rôle du fibrinogène et de la concentration en héparine.
Rev. Hémat. 1953, *8*, 156-170.

24. BURNSTEIN M., GUINAND A.
Sur la spécificité du fibrinogène des mammifères. Temps de thrombine du plasma de quelques mammifères. Rôle du pH et du calcium.
Rev. Hématol. 1954, *9*, 2, 231-242.

25. BURNSTEIN M. et GUINAND A.
Sur le pouvoir antithrombinique du fibrinogène de quelques mammifères.
Le sang, 1964, *25*, 919-924.

26. BURNSTEIN M. et LOEB. J.
Inhibition de la thrombinoformation par l'héparine. Le cofacteur plasmatique de l'héparine est-il l'antithrombine ?
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1956, *1*, 752-758.

27. CAPET-ANTONINI F.
La transformation fibrinogène-fibrine.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1963, *3*, 5, 587-602.

28. CARTER J.R.
Amperometric titration of SH Groups in purified clotting factors by improved method.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956, *91*, 3, 406-407.

29. CHANDRASEKHAR N., LAKI K.
Fibrin clot formation and the release of carbohydrate.
Biochem. Biophys. Acta 1964, *93*, 392-397.

30. CHANDRASEKHAR N., WAREN L., OS-BAHR A.S.
Rôle of sialic acid in fibrinogen.
Biochem. Biophys. Acta. 1962, *63*, 337-379.

31. CHIRIANO T., NARDI E.
Sulla composizione chimica del fibrinogeno e delle fibrina. Determinazione della composition glucidiche della fibrina di soggetti normali.
Progresso Med. 1961, *17*, 16, 535-539.

32. COLE E.R., KOPPEL J.L., OLWIN J.M.
Multiple specificity of thrombin for synthetic substrates.
Nature 1967, *213*, 5074, 405-406.

33. CROIZAT P., REVOL L., FAVRE-GILLY J.P.
Les hémorragies néo-natales dans les diathèses hémorragiques congénitales.
Nouv. Rev. Franç. Hémat., 1964, *4*, 1, 181-182.

34. CROIZAT P., REVOL L., CAMELIN A.
Etude génétique et clinique de l'afibrinogénémie congénitale.
Nouv. Rev. Fr. d'Hématologie. 1965, 5, 2, 570-582.

35. DAS P.C., ALLAN A.G.E., WOODFIELD D.G., CASH J.D.
Fibrin Degradation products in sera of normal subjects.
Brit. Med. J. 1967, *4*, 5581, 718-720.

36. DESTAING F., DUZER M., FERRAND B. et Coll.
Dosage du fibrinogène par la microméthode de coagulation de Von A. Clauss.
Pathol. Biol. 1960, *8*, 17/18, 1615-1621.

37. DJALDETTI M., COHEN I., JOSHUA H., and Coll.
In vivo and in vitro inactivation of fibrin stabilizing factor by Echiscolorata vanom.
Hémostase 1965, 5, 121-129.

38. DONNELLY T.H., LASKOWSKI M.J.R., NOTLEY N., and Coll.
Equilibria in the fibrinogen fibrin conversion. Reversibility of the polymerization steps.
Arch. Biochem. Biophys. 1955, 56, 2, 369-387.

38 *bis*. DUCKERT F., JUNG E., SHMERLING OH.
A Hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to a Fibrin stabiliging factor deficiency Thromb. Diathes, Haemorrh. 1960, 5, 179.

39. Editorial FSF.
Amer. J. Med., 1968, *44*, 1-7.

40. EGEBERG O.
On the natural blood coagulation inhibitor system : investigations of inhibitor factors based on antithrombin deficient blood.
Thromb. Diath. Haemor. 1965, *14*, 473-489.

41. EHRENPREIS S., SENERAGA M.A.
La cinétique de la conversion du fibrinogène en monomère de fibrine à pH neutre.
Arch. Biochem. Biophys., 1959, *79*, 27-43.

42. ENDRES G.F., EHRENPREIS S., SCHERAGA H.A.
Covalent bonding in the reversible polymerization of fibrin monomer.
Biochem. Biophys. Acta : 1965, *104*, 620-623.

43. ENDRES G.F., EHRENPREIS S., SCHERAGA H.A.
Equilibria in the fibrinogen-fibrin, conversion VI. Ionization changes in the reversible polymerization of fibrin monomer.
VII On the mechanism of the reversible polymerization of fibrin monomer.
Biochem. 1966, 5, 1561-67 et 1568-77.

44. FANTL P., WARD H.A.
Molecular weight of human fibrinogen derived from phosphorus determinations.
Biochem. J. 1965, *96*, 3, 885-889.

45. FAVRE-GILLY J., THOUVEREZ J.P., BELLEVILLE J.
Le temps de thrombine. Son intérêt dans le bilan de coagulation.
Hémostase 1963, *3*, 4, 351-358.

46. FAVRE-GILLY J., THOUVEREZ J.P., BELLEVILLE J.
Les techniques courantes de dosage du fibrinogène et de la fibrine.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1965, 5, 2, 335-345.

47. FERRI R.G., FERREIRA H.C.
Immunochemical studies of the circulating products of fibrinogenelysis in certain pathological conditions.
Vox Sang. 1963, *8*, 356-362.

48. FERRY J.
Polymerization of fibrinogen.
Physiol. Rev. 1954, *4*, 753-760.

49. FLETCHER A.P., ALKJAERSIG J., SHERRY S.
The proteolysis of fibrinogen by plasmin, the identification of thrombin clottable fibrinogen derivates which polymerize abnormally.
J. Lab. Clin. Med. 1966, *68*, 5, 780-802.

50. FIEHRER A.
Le facteur stabilisateur de la fibrine. Son intervention dans la formation du caillot.
Sem. Hôp. 1959, *35*, 948-950.

51. FINLAYSON J.S., MOSESSON M.W.
Subfractions of human fibrinogen. Préparation and analysis.
J. Lab. Clin. Med. 1963, *62*, 663-670.

52. FISHER S., RIKOVER M., NAOR S.
Factor XIII deficiency with severe hemorrhagic diathesis.
Blood 1966, *28*, 34-39.

53. FOLK J.E., GLADNER J.A.
The aminoacid sequeence of peptide B of cofibrin.
Biochem. Biophys. Acta, 1960, *44*, 2, 383-385.

54. FOLK J.E., GLADNER J.A., LAKI K.
Formation due à la thrombine de cofibrine. Etude préliminaire de la séquence des aminoacides sur les peptides A et B.
J. Biol. Chem. 1959, *234*, 1, 67-70.

55. FORDE J.P., O'CONNEL R.A., RYAN J.W.
Some factors influencing the hydrolysis of Benzoyl l arginine ethyl ester by human plasma.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962, *110*, 2, 375-377.

56. FORMAN W.B., BARNHART M.I.
Cellular site for fibrinogen synthesis.
J.A.M.A. 1964, *187*, 2, 128-132.

57. FOSTER J.B.T., DE NATALO A., DOTTI L.B.
Determination of plasma fibrinogen by means of centrifugation after heating.
Am. J. Clin. Pathol. 1959, *31*, 1, 42-45.

58. FOX F.J. Jr, WIDE L., KILLANDER J., and Coll.
Determination of fibrinogen and fibrinolysis products in human plasma by an immunochemical method.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1965, *17*, 341-348.

59. FREIMAN A.H., CLIFFTON E.E.
The effects of fibrinogen concentration on susceptibility of clots to in vitro clot lysis with plasmin.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1958, *2*, 269-278.

60. FRICK P.G.
Inhibition of conversion of fibrinogen to fibrin by abnormal proteins in multiple myeloma.
Am. J. Clin. Pathol. 1955, *25*, 11, 1 263-1 273.

61. FRICK P.G.
Les inhibiteurs de la phase terminale de la coagulation.
Le Sang 1959, *30*, 405-410.

62. GAERTNER H.A., OKULSKI J.
Antithrombin activity of serum from the native or recalcifield blood.
Folia Haemat. 1966, *86*, 454-458.

63. GASPARY E.A., KEKWICK R.A.
Observations on the molecular weight of human fibrinogen.
Biochem. J. 1954, *56*, 35-36.

64. GASPARY E.A., KEKWICK R.A.
Quelques propriétés physiochimiques du fibrinogène humain.
Biochem. J. 1957, *67*, 1, 47-48.

65. GITLIN D., BORGES W.H.
Studies on the metabolism of fibrinogen in two patients with congenital afibrinogenemia.
Blood, 1963, *8*, 679-686.

66. GLAS P., BELLER F.K.
Inhibition of clotting as the result of plasminogen activation by Streptokinase I. Studies of the inactivation of fibrinogen.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1960, 4/3/4, 507-519.

67. GODAL H.C.
The influence of heparin on the fibrin clot.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1961, *13*, 2, 306-313.

68. GORMSEN J., LAURSEN B.
Fibrinogen break-down products and clotting parameters.
Thromb. Diath. Haemorth., 1967, *17*, 467-481.

69. GORMSEN J., SIVERSTEIN U.
The effect of sulfhydrilinhibitors and glycine derivates on fibrin polymerisation and the physical strenght of fibrin in plasma.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1964, *11*, 3/4, 454-467.

70. GREENE R.W., MAC CONNAUGH Y.
Effects of thrombin and platelets concentration and clot retraction on fibrin strands width.
Journ. Clin. Investig. 1955, *34*, 417-425.

71. HALL C.E.
Electron microscopy of the fibrinogen molecules and the fibrin clot.
Lab. Invest. 1963, *12*, 10, 998-1 001.

72. HALL C.E. and SLAYTER H.S.
The fibrinogen molecule : size, shape, and mode of polymerisation.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1959, *5*, 11-16.

73. HENSEN A., LOELIGER E.A.
Antithrombin III. Its metabolism and its function in blood coagulation.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1963, *9*, Suppl. I (tout le numéro).

74. HENSTELL H.H., KLIGERMAN M.
Progressiv antithrombin : a three-phase system.
Blood 1966, *27*, 844-857.

75. HENSTELL H.H., KLIGERMAN M.
The nature of heparin antithrombin action.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1967, *18*, 167-178.

76. HIRSH J., FLECHTER A.P., SHERRY S.
Effect of fibrin and fibrinogen proteolysis products on clot physical properties.
Amer. J. Physiol. 1965, *209*, 2, 415-424.

77. HOLLARD D., SUSCILLON M., MARCILLE G., RAMBAUD F., BALOYAN M.
Rapport commissariat à l'Energie Atomique R. 2958 (1966).

78. HUNTER R.B., KOLLER F., BECK E.
Fibrinogen and fibrin turnover of clotting factors.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1964, Suppl. *13*, XII (tout le numéro).

79. IMPERATO A.M., DETTORI A.G.
Ipofibrinogenemia con fibrinoastenia.
Helv. Paediat. Acta. 1958, *13*, 380-399.

80. JACKSON H.O., BECK D., CHARACHE J.
Congenital disorders of fibrinogen.
Federation Proceedings 1965, *24*, 4, 1, 816-821.

81. JOSSO J., FAURE A.
La transformation du fibrinogène en fibrine. Polymérisation de la fibrine.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1965, 5, 2, 316-323.

82. JOSSO F., PROU WARTELLE O., ALAGILLE D., SOULIER J.P.
Le déficit congénital en facteur stabilisant de la fibrine (facteur XIII). Etude de deux cas.
Nouv. Rev. Hémat. 1964, *4*, 267-290.

83. JOSSO F., PETROVA M., MENACHE D., SIZONENKO P.
Durée de vie du facteur stabilisant de la fibrine (facteur XIII). Incidences thérapeutiques.
Transfusion (Paris) 1966, *9*, 343-346.

84. KAULLA E. Von, KAULLA KN. Von.
Antithrombin VI and diseases.
Amer. J. Clin. Path. 1967, *48*, 69-80.

85. KAY D., CUDDIGAN B.J.
The fine structure of fibrin.
Brit. J. Haemat. 1967, *13*, 341-347.

86. KAZAL L.A., GRANNIS G.F., TOCANTINS L.M.
The reactions of thrombin with fibrinogen and plasma antithrombin.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1965, *13*, 343-360.

87. KIESSELBACH T.H., WAGNER R.H.
Fibrin stabilizing factor : a thrombin-labile platelet protein.
Amer. J. Physiol. 1966, *211*, 1 472-1 476.

88. KOPEC M., KOWALSKI E., STACHUTSKA J.
Studies on paracoagulation ; rôle of antithrombin VI.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1960, 5, 285-295.

89. KOPPER P.H.
Role of calcium in fibrin formation.
Nature 1964, *198*, 4 879, 793-794.

90. KRICK J.A., MENACHE D.
Anomalie de la polymérisation de la fibrine dans un cas de gamma A myélome.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1966, *6*, 744-748.

91. LAKI K., CHANDRA SEKHAR N.
Sialic Acid in fibrinogen and « vulcanization » of the fibrin clot.
Nature 1963, *197*, 4 874, 1267-1268.

92. LAKI K., GLADNER J.A.
Chemistry and Physiology of the fibrinogen. Fibrin transition.
Physiol. Reviews 1964, *44*, 2, 127-160.

93. LAKI K., GLADNER J.A., FOLK J.E.
Some aspects of the fibrinogen-fibrin transition.
Nature 1960, *187*, 4 739, 758-761.

93 *bis*. LAKI K., LORAND L.
On the solubility of fibrin clots.
Science 1948, 108, 280.

94. LARRIEU M.J., FAUR Y., CAEN J., BERNARD J.
Syndrome biologique de l'afibrinémie congénitale.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1965, 5, 2, 368-376.

95. LARRIEU M.J., INCEMAN S., MARDER V.
Action des produits de dégradation du fibrinogène sur les fonctions plaquettaires.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1967, *7*, 5, 691-704.

96. LASKOWSKI M. Jr, DONNELLY J.M., VAN TIJN B.A.
The proteolytic action of thrombin on fibrinogen.
J. Biol. Chem. 1956, *222*, 2, 815-821.

97. LATALLO Z.S., BUDZYNSKI A.S., PIPINSKI B.
Inhibition of thrombin and of fibrin polymerization, two activities derived from plasmin digested fibrinogen.
Nature 1964, *203*, 1184-1185.

98. LATALLO S., FLECHTER A.P., ALKJAERSIG N.
Influence of pH ionic strenght neutral ions and thrombin on fibrin polymerization.
Am. J. Physiol. 1962, *202*, 4, 675-680.

99. LATALLO Z.S., FLETCHER A.P., ALKJAERSIG N.
Inhibition of fibrin polymerization by fibrinogen proteolysis products.
Am. J. Physiol. 1962, *202*, 4, 681-686.

100. LEWIS J.M., SZETO I.L.F., ELLIS L.D., BAYER W.L.
An acquired inhibition to coagulation factor XIII.
Fed. Proc. 1967, *26*, 488.

101. LEWIS J.H., WILSON J.H.
Fibrinogen breakdown products.
Am. J. Physiol. 1964, *207*, 1 053-1 057.

102. LIPINSKI B., WEGRYNOWICZ Z., BUDZYNSKI A.Z., KOWALSKI E.
Soluble unclottable complexes formed in the presence of fibrinogen degradation products (P.D.F.) during the fibrinogen fibrin conversion and their potential significance in pathology.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1967, *17*, 65-67.

103. LOEWY A.G., DAHLBERG A., DUNATHAN K.
Fibrinase II. Some physical properties.
J. Biol. Chem., 1961, *236*, 10, 2635-2643.

104. LOEWY A.G., DUNATHAN K, KRIEL R.
Fibrinase I. Purification of substrate and enzyme.
J. Biol. Chem. 1961, *236*, 2625-2633.

105. LOEWY A.G., DUNATHAN K., GALLANT J.A.
Fibrinase III. Some enzymatic properties IV effect on fibrin solubility.
J. Biol. Chem. 1961, *236*, 10, 2644-2647 et 2648-2655.

106. LOEWY A.G., EDSALL J.T.
Etudes sur la formation de la fibrine soluble dans l'urée.
J. Biol. Chem. 1954, *211*, 2, 829-838.

107. LOEWY A.G., MATACIC S., DARNELL J.H.
Transamidase activity of the enzyme responsable for insoluble fibrin formation.
Arch. Biochem. Biophys. 1966, *113*, 435-438.

108. LOEWY A.G., VENEZIALE C., FORMAN M.
Purification of the factor involved in the formation of uree insoluble fibrin.
Biochem. Biophys. Acta 1957, *26*, 3, 670.

109. LORAND L.
Labeling of amino acceptor cross linking sites of fibrin by transpeptidation.
Biochemistry 1966, *5*, 1747-1753.

110. LORAND L., JACOBSEN A.
Studies on the polymerization of fibrin the role of the globulin-fibrin-stabilizing factor.
J. Biol. Chem. 1958. *230*, 421-434.

111. LORAND L., JACOBSEN A., BRUNER-LORAND J.
A pathologic inhibitor of fibrin cross linking.
J. of Clin. Investig. 1968, *47*, n° 2, 268-273.

112. LORAND L., KONISHI K.
Activation of the fibrin stabilizing factor of plasma by thrombin.
Arch. Biochem. Biophys. 1964, *105*, 58-67.

113. LORAND L., MIDDLEBROOK W.R.
Studies on fibrinopeptides.
Biochem. Biophys. Acta 1952, *9*, 581-582.

114. LOSOWSKY M.S., HALL R., GOLDIE W.
Congenital deficiency of fibrin-stabilizing factor. A report of 3 unrelated cases.
Lancet 1965, 2, 156-158.

115. LORAND L., ONG H.M., RULE N.G., LIPINSKI B., DOWNEY W.L.
Gamma glutamyl e Lysin in the cross linking of fibrinogen.
Fed. Proc. 1967, *26*, 538.

116. LOSSNER-VOLK B.N.
La concentration en fibrinogène dans différentes conditions cliniques.
Am. J. Med. Sci. 1956, *232*, 3, 276-283.

117. LIPINSKI B., WEGRZYNOWICZ Z., BUDZYNSKI A.Z., KOWALSKI E.
Soluble unclottable complexes formed in the presence of fibrinogen degradation product (F.D.F.) during the fibrinogen-fibrin conversion and their potential significance in pathology.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1967, *17*, 65-77.

118. LUSCHER E.F.
Un facteur plaquettaire stabilisateur de la fibrine.
Schweiss Med. Wschr. 1957, *87*, 1220-1221.

119. MC KEE P.A., ROGERS L.A., MARLER E.
The subunit polypeptides of human fibrinogen.
Arch Biochem. Biophys. 1966, *116*, 1/3, 271-279.

120. MANNINGA L.B., GUEST M.M.
Preparation and properties of anticoagulant split product of fibrinogen and its determination in plasma.
Thromb. Diath. Haemorrh 1967, *17*, 440-451.

121. MARCHAL G., DUHAMEL G., SAMAMA M.
Thrombose massive des vaisseaux d'un membre au cours d'une hypofibrinemie congénitale.
Hémostase 1964, *4*, 81-89.

122. MARCHAL G., LEROUX M.E., SAMAMA M.
La thrombodynamographie dans l'étude de la fibrinoformation.
Nouv. Revue Franç. Hémat. 1965, 5, 2, 354-362.

123. MASURE R.
Trouble congénital de l'hémostase associé à un déficit en facteur XIII.
Hémostase 1963, *9*, 119-122.

124. MENACHE D.
La transformation du fibrinogène en fibrine. Action de la thrombine sur le fibrinogène.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1965, 5, 2, 309-315.

125. MENACHE D.
Constitutional and Familial Abnormal fibrinogen.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1963, Suppl. 13, 173-185.

126. MESTER L., MOCZAR E., WASS G.
Structure et rôle des fractions glucidiques du fibrinogène.
Path. Biol. 1965, *13*, 540-545.

127. MESTER L., MOCZAR E.
Localisation des chaînes glucidiques dans la molécule du fibrinogène.
CR Acad. Sc. Paris 1965, *260*, 2617-2618.

128. MESTER L., MOCZAR E., LAKI K.
Structure et rôle de la partie glucidique du fibrinogène et de la fibrine sur les liaisons des composés glucidiques.
C R Acad. Sc. 1963, 251, 307-308.

129. MESTER L., SZABADOS L., GOLLWITZER R.
Sur la prétendue libération d'hexoses au cours de la transformation du fibrinogène en fibrine.
CR Acad. Sc. Paris 1966, *262*, 1 382-1 384.

130. MESTER L., SZABADOS L.
Différences constitutionnelles dans les fragments glucidiques du fibrinogène humain anormal.
CR Acad. Sc. 1967.

131. MIHALYL E., BILLICK S.M.
Transformation of fibrinogen into fibrin III. Kinetics of the pH changes associated with the clotting of fibrinogen.
Biochem. Biophys. Acta, 1963, *71*, 97-108.

132. MOSESSON M.W., ALKJAERSIG N., SWETT B., SHERRY S.
Human fibrinogen of relatively high solubility. Comparative biophysical, biochemical and biological studies with fibrinogen of lower solubility.
Biochemistry 1967, *6*, 3279-3287.

133. DE NICOLA P., SPREAFICO P.L.
Studies on the evaluation of factor XIII (fibrin stabilizing factor) by means of the MIA tolerance (visual and thromboelastographic technique).
Hemostase 1966, *6*, 326-332.

134. NIEWIAROWSKI S., KOWALSKI E.
Un nouvel anticoagulant dérivé du fibrinogène.
Rev. Hémat. 1958, *13*, 320-328.

135. NILEHN J.E.
Split products of fibrinogen after prolonged interaction with plasmin.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1967, *18*, 89-100.

136. NILEHN J.E., ROBERTSON B.
On the degradation product of fibrinogen or fibrin after infusion of streptokinase in patients with venous thrombosis.
Scand. J. Haemat. 1965, *2*, 267-276.

137. NUSSBAUM M., MORSE B.S.
Plasma fibrin stabilizing factor activity in various diseases.
Blood 1964, *23*, 669-678.

138. NUSSENZWEIG J., SELIGMAN M., GRABAR P.
Les produits de dégradation par la plasmine. Etude immunologique. Mise en évidence d'anticorps antifibrinogène natif possédant des specificités différentes.
Ann. Institut Pasteur 1961, 100, 4, 490-508.

139. NUSSENZWEIG J., SELIGMAN M., PELMONT J.
Les produits de dégradation du fibrinogène par la plasmine I. Séparation et propriétés physico-chimiques.
Ann. Institut Pasteur 1961, *100*, 3, 377-385.

140. OSBAHR R.J., GLADNER J.A.
Studies on the physiological activity of the peptide released during the fibrinogen-fibrin conversion.
Biochem. Biophys. Acta. 1964, *86*, 3, 535-542.

141. OTTAVIANI P., MANDELLI F.
Two cases of haemorrhagic disease arising from fibrin stabilizing.
factor deficiency.
Hémostase 1966, 6, 317-324.

142. PERKINS H.A., ROLPS M.R.
Quantitative assay of fibrinogen and fibrinolytic activities.
Blood 1963, *22*, 3, 485-498.

143. PERSSON I.
Normal values for plasma fibrin in the age groups 20.50 years.
Scand J. Clin Lab. Invest 1955, 7, 4, 279-283.

144. PORTER P., PORTER MC, SHANBERGE J.N.
Heparin cofactor and plasma antithrombin in relation to the mechanism of inactivation of thrombin by heparin.
Clin. Chim. Acta 1967, *17*, 189-200.

145. PORTER P., PORTER M.C., SHANBERGE J.N.
Interaction of héparin with the plasma proteins in relation to its antithrombin activity.
Biochemistry 1967, *6*, 1854-1863.

146. PRAGA C., JEAN G., CORTELLARO M.
Anomalie de la formation du caillot dans un cas de IgG myélome. Influence de la paraprotéine isolée sur la coagulation et étude ultrastructurale du caillot.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1967, 7, 353-366.

147. RABY C.
Biologie des hémorragies et des thromboses.
Masson Editeurs 1966, P. 128.

148. RATNOFF O.D.
Communication personnelle.

149. RATNOFF O.D., STEINBERG A.G.
Inheritance of fibrin-stabilizing factor deficiency.
Lancet 1968, *1*, 25-26.

150. ROSENBERG A., CARMAN R.M.
Release of carbohydrate from fibrin-monomer during clotting.
Nature, 1964, 204, 4962, 994-995.

151. ROSENFELD G., JANSZKY B.
The accelerating effect of calcium on the fibrinogen-fibrin transformation.
Science 1952, *116*, 3002, 36-37.

152. ROSZKOWSKI I., NIEWIAROWSKI M., BAR PRATKOWSKA J.
Fibrinogen derived coagulation inhibitors in obstetric cases of acute fibrinolysis.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1965, *13*, 25-34.

153. SALMON J.
Etude immunochimique du fibrinogène et de ses dérivés.
Clin. Chim. Acta 1959, *4*, 767-775.

154. SALMON J.
Apport de l'immunochimie dans le diagnostic des hypofibrinogénies.
Acta Clin. Belgica 1965, *20*, 442-443. (Abstracts.)

155. SAMAMA M., ABASTADO M., PROST R.J., GOGLIN G., CASTEL A., BILSKI-PASQUIER G., SOULIE P., MARCHAL G.
Surveillance biologique du traitement thrombolytique.
Angéiologie 1963, 15, 25-35.

156. SAMAMA M., YVER J., CASUBOLO L., SORIA J., BOUSSER J.
Données biologiques fournies par l'expérience des traitements thrombolytiques par la streptokinase.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1968, 1, 8, 84-92.

157. SASAKI T., PAGE I.H., SHAINOFF J.R.
Stable complex of fibrinogen and fibrin.
Science 1966, *152*, 1069-1071.

158. SCHWERTG W., TAKENAKA Y.
Spectrophotométric détermination of trypsin and chymotrypsin.
Biochem. Biophys. Acta 1955, 16, 570-582.

159. SHULMAN S., FERRY J.D., TINOCO J. Jr.
The conversion of fibrinogen to fibrin, influence of pH ionic strenght and hexamethylene glycol concentration on the polymerization of fibrinogen.
Arch. Biochem. Biophys. 1953, *42*, 2, 245-256.

160. SIGG P.
The monoiodocetate (M I A) tolerance test, a new quantitative method for the fibrin stabilizing factor (factor XIII) assay.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1966, *15*, 238-251.

161. SOULIER J.P.
Action enzymatique de la thrombine sur le fibrinogène.
Ann. Biol. Clin. 1964, *22*, 3/4, 325-340.

162. SOULIER J.P.
Métabolisme du fibrinogène.
Nouv. Revue Franç. Hémat. 1965, 5, 2, 323-327.

163. STEINBUCH M., BLATRIX C., JOSSO F.
Alpha 2 macroglobulin as progressive antithrombin.
Nature 1967, *216*, 500-501.

164. STEINBUCK M., BLATRIX C., JOSSO J.
Action antiprotease de l'alpha 2 macroglubuline. Son rôle d'antithrombine progressive.
Rev. Franç. Etud. Clin. et Biol. 1968, XIII, N° 2, 179-186.

165. SWIGERT S., KOPPEL J.L., OLWIN J.H.
Selective inactivation of fibrin stabilizing factor contaminant in fibrinogen.
Nature 1963, 198, 4882, 797-798.

166. SZILAGYI T., BAGDY D.
Les propriétés antigéniques de la fibrine.
2 Zft f Immun. Fersch. 1955, *112*, 403-408.

167. TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C.
Nature of the thrombin inhibiting effect of incubated fibrinogen.
Am J. Physiol. 1959, *197*, 575-579.

168. TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C.
New anticoagulant from lysed fibrinogen.
Brit. J. Haemat. 1967, *13*, 1, 28-41.

169. THOMAS L., SMITH R.T., VON KORFF R.
Studies on the generalized Schwartzman reaction. VII the role of fibrinogen in the deposition of fibrinoid after combined infections of endotoxin and synthetic acidic polymer.
J. Exp. Med. 1955, 102, 263-278.

170. TROLL W., SHERRY S.
Substrats synthétiques de plasmine et de thrombine.
Biol. Bulletin 1953, *105*, 2, 360.

171. TYLER N.M.
A comparative study of the solvants commonly used to detect fibrin stabilisation.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1966, *16*, 1/2, 61-68.

172. TYLER H.M.
Hexose content of bovine fibrinogen and fibrin, and evidence against its release by fibrin stabilizing factor.
Nature 1966, *210*, 1045-1046.

173. VERMYLEN C., VERSTRAETE M.
Antithrombin V critical evaluation of its assessment and properties.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1960, 5, 267-284.

174. VERMYLEN C., VERSTRAETE M.
Différenciation des inhibiteurs de la conversion du fibrinogène en fibrine.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1965, 5, 376-382.

175. VERMYLEN C., VREKER R.A., VERSTRAETE M.
A rapid enzymatic method for assay of fibrinogen fibrin polymerisation time (F.P.T. Test).
Clin. Chim. Acta 1963, *8*, 3, 418-424.

176. VERSTRAETE M., VERMYLEN C.
Antithrombin I activity.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1959, *3*, 640-653.

177. VERSTRAETE M., VERMYLEN C.
Recherches sur l'antithrombine V dans la maladie de Kahler.
Acta Haematol. 1959, *22*, 240-254.

177 *bis*. VON FELTEN A., DUCKERT F., FRICK P.G.
Familial disturbance of fibrin monomer aggregation.
Brit. J. Haematol. 1966, 12, 667-677.

178. VON KAULLA K.N., SMITH R.L.
Plasma clot dissolution by urea derivates.
Nature 1961, *190*, 4774, 449-450.

179. WOROWSKI K., NIEWIAROWSKI S., PROKOPOWICZ J.
Fibrinolysis and fibrinogen breakdown products (antithrombin VI) in renal venous blood (R. VB) in dlg.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1964, *12*, 1/2, 87-104.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 31

CHAPITRE PREMIER

Rappel sur la physio-pathologie et l'exploration de la fibrinoformation 33

I. Physiologie de la fibrinoformation 34

A) Le fibrinogène 34
1) L'étude de sa structure au microscope électronique.
2) L'étude chimique.
3) La synthèse du fibrinogène.
B) La fibrinoformation 36
1) Action protéolytique de la thrombine.
2) Agrégation des monomères de fibrine.
3) Transformation du polymère instable en polymère stable par l'intervention du facteur de stabilisation de la fibrine.
C) Inhibiteurs de la fibrinoformation 40
1) Inhibiteurs physiologiques 40
a) antithrombine I
b) antithrombine II
c) antithrombine III
d) antithrombine IV
2) Inhibiteurs pathologiques 42
a) antithrombine V
b) antithrombine VI
c) inhibiteurs du F.S.F.

II. Exploration de la fibrinoformation 43

A) Dosage du fibrinogène 43
B) Thromboélastographie 44
C) Temps de thrombine 44
D) Etude photométrique de la polymérisation de la fibrine 45
E) Etude des antithrombines 46
1) Mise en évidence d'antithrombines vraies 46
2) Mise en évidence d'antipolymérases 46
F) Détermination du facteur de stabilisation de la fibrine 47
1) Cas de déficit total 47
2) Cas de déficit important, mais incomplet 47
G) Immunoélectrophèse du fibrinogène 48

III. Pathologie de la fibrinoformation 48

A) Anomalies au niveau du substrat 48
1) Diminution du taux de fibrinogène 48
a) Défaut de synthèse du fibrinogène, au niveau de la cellule hépatique.
α) Anomalies acquises.
β) Anomalies congénitales.

— afibrinogénémie congénitale.
— hypofibrinogénémie congénitale.
b) Destruction exagérée du fibrinogène.
α) Fibrinolyses.
β) Coagulations intra-vasculaires.
2) Augmentation du taux de fibrinogène 51
3) Dysfibrinogénémies 51
B) Anomalies dues à la présence d'antithrombines 52
1) Antithrombine V.
2) Antithrombine VI.
C) Déficit en F.S.F. 52

CHAPITRE II

La fibrinoformation. Etude expérimentale des méthodes utilisées 55

I. Dosage du fibrinogène. Etude comparée des différentes techniques.
A) Méthode du premier groupe 57
Technique gravimétrique.
B) Méthodes du deuxième groupe 57
1) Technique par précipitation au sulfate d'ammonium 57
2) Technique par précipitation à 56° C 58
C) Méthode du troisième groupe 58
Technique modifiée de Von Clauss.

II. Temps de thrombine et temps de Reptilase 59

Analyse des allongements du temps de thrombine au cours des différents troubles de la fibrinoformation.
A) Temps de thrombine 59
B) Temps de reptilase 60

III. Courbes de polymérisation de la fibrine 61

A) Technique de Bouvier - Rôle de différents paramètres 61
1) Influence de la concentration en susbrat 62
2) Influence de la concentration en enzyme 63
3) Influence de la force ionique du milieu 63
4) Influence du calcium 64
5) Influence du pH 64
6) Influence du vieillissement du plasma 65
7) Influence du nombre des plaquettes 66
8) Influence des équivalents plaquettaires 67
B) Technique de Hollard et Suscillon - Rôle de différents paramètres 68
1) Influence de la concentration en substrat 68
2) Influence de la concentration en enzyme 69
3) Influence du calcium 69
C) Technique de polymérisation de la fibrine, induite par la Reptilase 70

IV. Recherche d'une activité antithrombique 73

A) Technique photométrique de Schwert-Takenaka 73
B) Technique au pH stat 75

V. Recherche d'une activité antipolymérase 77

A) Préparation des monomères de fibrine selon Donnelly et Latallo - Application à la recherche d'une antipolymérase 77
1) Préparation des monomères 77
2) Conservation des monomères 78
3) Polymérisation des monomères 79
B) Préparation des monomères de fibrine selon Ratnoff. Application à la recherche d'une antipolymérase 80
1) Préparation des monomères 80
2) Polymérisation des monomères 80

VI. Dosage du facteur de stabilisation de la fibrine 83

A) Détermination de la concentration en ions calcium conduisant à l'activation idéale du F.S.F. 83
B) Etude comparative des différentes méthodes de dosage du F.S.F. 85
1) Méthode biologique 85
a) Principe.
b) Préparation du fibrinogène dépourvue de F.S.F.
c) Exécution de la technique.
d) Résultats.
f) Variante personnelle.
2) Méthodes basées sur le dosage des groupements - SH libres dans le F.S.F. 89
a) Etude basée sur l'inactivation du F.S.F. par blocage des groupements - SH.
α) Technique proposée par Sigg et Duckert.
β) Essai de modification de la technique de Sigg et Duckert.
b) Etude du dosage des groupements - SH libres par une méthode ampérométrique.
α) Principe.
β) Appareillage.
γ) Technique utilisée.
C) Résultats - Intérêt et critique de chaque technique .. 98

VII. Etude immuno-électrophorétique du fibrinogène et de ses produits de dégradation 100

CHAPITRE III

Troubles de la fibrinoformation. Etude analytique 103

I. Traitement par l'héparine 106

II. Traitement par le Dextran et le Rhéomanodex 109

III. Dysfibrinogénémie rencontrée au cours d'un ictère grave 111

A) Analyse de l'allongement du temps de thrombine et du temps de reptilase 112
B) Etude de la polymérisation de la fibrine au spectrophotomètre 112
1) Courbe effectuée avec le plasma du malades (technique de Bouvier) 112

2) Courbe effectuée avec la solution d'euglobulines du malade 112
3) Courbes effectuées en abaissant la force ionique du milieu 113
C) Etude immuno-électrophorétique du fibrinogène 114
D) Etude chimique de la molécule de fibrinogène 114
E) Conclusion 115

IV. Dysfibrinogénémie congénitale et familiale 116

A) Bilan classique de l'hémostase - Dépistage de l'anomalie 116
1) Temps de Quick 116
2) Taux de fibrinogène 117
3) Temps de thrombine, et temps de reptilase 117
4) Recherche d'une antithrombine sérique 118
5) Taux de facteur XIII 118
6) Etude de l'activité fibrinolytique 118
B) Localisation de l'anomalie 118
1) Absence de correction du temps de thrombine et du temps de reptilase par apport de plasma témoin 118
2) Absence de correction du temps de thrombine par apport de chlorure de calcium 119
3) Courbe de polymérisation de la fibrine 119
4) Recherche d'activité antipolymérase du fibrinogène anormal 120
a) Technique de Donnelly modifiée par Latallo.
b) Technique de Ratnoff.
5) Etude immuno-électrophorétique du fibrinogène du malade 121
6) Aspect du caillot au microscope électronique 121
C) Mode de transmission génétique de l'anomalie 122
D) Anomalie et tendance au saignement 122
E) Confrontation des différents cas connus de dysfibrinogénémie congénitale - Conclusion 122

V. Thrombolyse 124

A) Etude in vitro 125
1) Préparation des produits de dégradation 125
2) Influence des produits de dégradation de la fibrine sur le dosage du fibrinogène 126
3) Influence des produits de dégradation de la fibrine sur le temps de thrombine et le temps de reptilase 127
4) Influence des produits de dégradation de la fibrine sur les courbes de polymérisation effectuées en présence de thrombine et de reptilase 128
5) Localisation du trouble de la fibrinoformation 130
a) Recherche d'une action antithrombique - Thrombine testée avec la Benzoyl-Arginine éthyl ester (B.A.E.E.).
α) Technique spectrophotométrique de Schwert - Takenaka.
β) Technique au pH stat.
γ) Conclusion.
b) Recherche d'une activité antipolymérase des produits de dégradation de la fibrine.

α) Etude effectuée à partir des monomères préparés selon Donnelly et Latallo.
β) Etude effectuée à partir des monomères préparés selon Ratnoff.
γ) Conclusion.
C) Recherche d'une action antithrombique éventuelle - Thrombine testée avec le fibrinogène.
B) Etude in vitro 137
1) Evaluation du taux de fibrinogène - Problèmes posés par son évaluation 139
2) Amplitude maximale du thromboélastogramme 139
3) Temps de thrombine 140
4) Courbe de polymérisation de la fibrine 141
5) Incidence hémorragique 143
6) Conclusion 144

VI. Troubles de la polymérisation dans un cas de Myelome 146

A) Dépistage de l'anomalie de la fibrinoformation 146
1) Thromboélastographie 146
2) Temps de thrombine 146
3) Etude de la courbe de polymérisation de la fibrine 147
B) Rapport entre la paraprotéine myelomateuse et le trouble de la fibrinoformation 147
1) Isolement de la paraprotéine 148
2) Expérience avec l'IgG isolée 148
a) Action sur le temps de thrombine.
b) Action sur la courbe de polymérisation de la fibrine.
c) Mode d'action de la paraprotéine sur le trouble de la fibrinoformation.
α) Recherche d'une action antithrombique - Thrombine testée avec la Benzoyl-Aginine ethyl ester.
β) Recherche d'une action antipolymérase.
γ) Recherche d'une action antithrombique : Thrombine testée avec le fibrinogène.
C) Conclusion.

VII. Taux de facteur de stabilisation de la fibrine dans divers cas pathologiques 154
A) Chez 100 sujets normaux 154
B) Chez 70 cirrhotiques 154
C) Chez les malades présentant une coagulation intravasculaire 154
Conclusion 155

CONCLUSION 156

Vu et permis d'imprimer
Paris le 2 octobre 1968
le Doyen P. Malangeau

Série E n° 179